

**L'IMPLICATION DE LA PROTÉINE KDM5A LORS DE L'EXPRESSION DES GÈNES  
SOUS LE CONTRÔLE DU RÉCEPTEUR À L'ŒSTROGÈNE  $\alpha$**

**par**

**Lydia Plante**

**mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)**

**FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

**Sherbrooke, Québec, Canada, juillet 2011**



**Library and Archives  
Canada**

**Published Heritage  
Branch**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque et  
Archives Canada**

**Direction du  
Patrimoine de l'édition**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Your file Votre référence**

**ISBN: 978-0-494-83666-8**

**Our file Notre référence**

**ISBN: 978-0-494-83666-8**

**NOTICE:**

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

**AVIS:**

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

---

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

**Canada**

**Le 10 août 2011**

***le jury a accepté le mémoire de Madame Lydia Plante  
dans sa version finale.***

**Membres du jury**

**Professeur Nicolas Gévry  
Directeur de recherche  
Département de biologie**

**Professeur Luc R. Gaudreau  
Membre  
Département de biologie**

**Professeur Viktor Steimle  
Président rapporteur  
Département de biologie**

## SOMMAIRE

L'œstrogène joue un rôle important dans plusieurs processus physiologiques, tels la reproduction, le développement et le métabolisme cellulaire. Ses fonctions biologiques sont orchestrées par deux membres de la famille des récepteurs nucléaires, soit les récepteurs de l'œstrogène (ERs)  $\alpha$  et  $\beta$ . Ceux-ci sont des facteurs de transcription inductibles par leur ligand naturel, le 17  $\beta$  -œstradiol (E2). Le mode d'action des ER suggère que les récepteurs stimulent la transcription par le recrutement de différents complexes nécessaires à l'activation des gènes cibles et par la mise en place d'une architecture de la chromatine favorable à l'expression génique. Il est maintenant accepté que les mécanismes épigénétiques, incluant les voies de signalisation impliquant la méthylation et la déméthylation de l'histone H3 sur sa lysine 4, sont essentiels afin d'établir un contrôle de l'expression des gènes cibles d'ERs. Par ces mécanismes, les enzymes impliquées dans cette voie constituent un instrument de régulation versatile et idéal, assurant des changements dynamiques de l'expression des gènes contrôlés par ERs. Par exemple, la di- et tri-méthylation de la lysine 4 de l'histone 3 (H3K4me2/me3) est étroitement associée au promoteur en 5' du gène actif (TSS) et les régions régulatrices de certains gènes. Jusqu'à présent, plusieurs méthyltransférases de H3K4 ont été identifiées et nommées « members of the Mixed Lineage Leukemia ». De récentes investigations ont démontré que certaines protéines de ces complexes interagissent avec ER $\alpha$  et sont impliquées dans l'activation des gènes cibles d'ER $\alpha$ . Également, ces protéines sont bien connues pour leur rôle de coactivateur de la transcription.

Avant 2004, la méthylation des histones était considérée comme une modification stable définie par un programme épigénétique tout comme la méthylation de l'ADN. La découverte d'enzymes possédant une activité déméthylase, agissant sur les résidus lysine des histones, démontre une dynamique plus complexe des modifications épigénétiques. Parmi les déméthylases identifiées, la protéine KDM5a, aussi connue sous le nom de « retinoblastoma-binding protein 2 » (RBP2), a été identifiée. Cette protéine possède la capacité de retirer la triméthylation sur H3K4. De plus, il a été montré que KDM5a pouvait interagir directement avec le domaine de liaison à l'ADN de ER $\alpha$ . L'implication de la protéine KDM5a dans la voie

de signalisation d'ER $\alpha$  suggère un mécanisme de régulation générale pour la transcription par ER $\alpha$ . Celle-ci coordonne l'interaction entre les coactivateurs et les corépresseurs tout en contribuant au contrôle de la transcription.

Cette étude avait pour but de démontrer le rôle de la protéine KDM5a pour l'expression des gènes régulés par les récepteurs nucléaires tel le récepteur de l'œstrogène  $\alpha$ . Notre hypothèse était que la protéine KDM5a permet l'activation des gènes régulés par le récepteur de l'œstrogène, via la déméthylation de H3K4.

Dans cette étude, nous avons montré le rôle coactivateur de la protéine KDM5a pour l'expression des gènes dépendants du ER $\alpha$ . En effet, la déplétion de la protéine KDM5a dans les cellules MCF-7 a montré une diminution importante de l'expression des gènes contrôlés par ER $\alpha$ . De plus, les expériences d'immunoprécipitation de la chromatine suivies du séquençage ont montré sa présence au niveau du TSS de l'ensemble des gènes. En outre, sa présence au TSS du gène *TFF1*, gène modèle pour l'étude sur les récepteurs de l'œstrogène, a été montrée par immunoprécipitation de la chromatine. Également, les études de l'immunoprécipitation de la chromatine ont montré son rôle pour le recrutement du récepteur de l'œstrogène  $\alpha$  et de l'ARN polIII. De plus, cette étude a montré que sa présence est nécessaire pour les marques de méthylation H3K4me3/me2. En effet, la diminution de la protéine KDM5a conduit à la perte de ces marques sur le gène *TFF1*.

## REMERCIEMENTS

J'aimerais remercier mon superviseur, le Dr. Nicolas Gévry, pour son appui et son enthousiasme face au développement de ce projet.

Je voudrais remercier mon comité conseil, le Dr Luc Gaudreau et le Dr. Viktor Steimle pour leur soutien.

J'aimerais remercier le Dr. Elizaveta Benevolenskaya pour les expériences de ChIP seq fait à son laboratoire et pour m'avoir généreusement donné l'anticorps KDM5a utilisé dans mon projet. Je tiens également à remercier son étudiant, Khademul Islam, pour les analyses bioinformatiques.

Je voudrais remercier Manon Dufresne qui a cultivé les lignées cellulaires utilisées dans ce projet.

Je voudrais remercier tous mes collègues de laboratoire. Mes remerciements s'adressent d'abord à Amy Sotelis qui m'a été d'une aide, ô combien appréciée, avec ses nombreux conseils et son expérience exceptionnelle en laboratoire. Merci d'avoir été là et d'avoir pris le temps! Je voudrais remercier Guylaine Nolet pour son soutien, autant technique que moral. J'ai été très heureuse de te côtoyer durant ces quelques années. Je remercie Stéphanie Bianco, Mylène Brunelle et Maika Jangal qui ont répondu à plusieurs de mes interrogations et ont fourni des commentaires fort utiles pour l'amélioration de mes travaux. Merci à Gabrielle Huppé pour toutes les commandes de matériel effectuées. Je remercie Alexei Nordell Markovits de m'avoir expliqué plusieurs notions en bioinformatique. En terminant, je ne peux passer sous silence l'aide précieuse de Marzoq Alotaibi qui a donné généreusement de son temps pour la réalisation de mon séminaire et la rédaction de ce mémoire. Merci à toi! Tes commentaires et suggestions ont été plus qu'appréciés.

# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS .....</b>	<b>IV</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>V</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>VII</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>XI</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>XII</b>
<b>CHAPITRE 1 .....</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 La chromatine .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 La structure et l'organisation de la chromatine .....	2
1.1.2 Les mécanismes de remodelage de la chromatine .....	5
1.1.2.1 Les mécanismes dépendant de l'ATP .....	6
1.1.2.2 L'incorporation de variants d'histones.....	7
1.1.2.2.1 Les variants de l'histone H2A .....	7
1.1.2.2.2 Les variants de l'histone H3 .....	8
1.1.2.3 Les modifications post-traductionnelles des histones .....	9
1.1.2.3.1 La phosphorylation et l'ubiquitination des histones.....	10
1.1.2.3.2 L'acétylation des histones .....	10
1.1.2.3.3 La méthylation des histones .....	11
1.1.2.3.4 La déméthylation des histones .....	13
1.1.2.3.5 Les classes de déméthylases.....	15
1.1.2.3.6 La famille JARID1 .....	16
1.1.2.3.7 Les domaines fonctionnels de la famille JARID1.....	17
1.1.2.3.8 La protéine KDM5a.....	19
<b>1.2 La transcription .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3 Rôles physiologiques des hormones stéroïdiennes.....</b>	<b>24</b>
1.3.1 Les œstrogènes.....	25
1.3.1.1 Les récepteurs des œstrogènes .....	26
1.3.1.1.1 La structure des récepteurs de l'œstrogène .....	27
1.3.1.1.2 Régulation dépendant des récepteurs aux œstrogènes .....	29
1.3.1.1.3 Les voies de signalisation génomique .....	30

1.3.1.1.4	La voie classique .....	30
1.3.1.1.5	La voie indépendante de l'ERE.....	32
1.3.1.1.6	La voie indépendante du ligand.....	32
1.3.1.1.7	La voie non-génomique.....	32
1.3.2	Les cancers hormonaux dépendants associés .....	33
1.4	Hypothèse et objectifs.....	34
<b>MATÉRIELS ET MÉTHODES .....</b>		<b>36</b>
2.1	ARN interférants, vecteurs d'expression et transfection .....	36
2.2	Culture cellulaire .....	37
2.3	Extraction d'ARN et RT-qPCR .....	38
2.4	Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) .....	38
2.5	Immunoprécipitation de la chromatine suivie du séquençage .....	40
2.6	Extraction des protéines.....	40
2.7	Immunobuvardage de type western.....	41
<b>RÉSULTATS.....</b>		<b>43</b>
2.1	L'identification d'un ARN interférant (sh ARN) efficace pour la déplétion de KDM5a .....	43
2.2	L'ARN interférant utilisé est spécifique à KDM5a .....	44
2.3	L'expression du gène KDM5a n'est pas affectée par l'œstrogène.....	45
2.4	Le rôle de KDM5a pour la régulation des gènes dépendants du ER $\alpha$ .....	46
2.5	La localisation dans le génome de la protéine KDM5a .....	48
2.6	La localisation de la protéine KDM5a, l'ARN polII et la marque H3K4me3.....	50
2.7	La déplétion de KDM5a diminue le recrutement du ER $\alpha$ , de l'ARN polII et des marques d'histones .....	51
<b>DICUSSION .....</b>		<b>55</b>
3.1	KDM5a et ER $\alpha$ .....	55
3.2	KDM5a et la déméthylation de H3K4me2/me3 .....	56
3.3	Les mécanismes de régulation de l'activité enzymatique .....	58
<b>CONCLUSION .....</b>		<b>61</b>



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

µg : Microgramme

µl : Microlitre

ac : Acétylation

ADN : Acide désoxyribonucléique

AF-1 : *Activation function 1* (Fonction d'activation 1)

AF-2 : *Activation function 2* (Fonction d'activation 2)

AMP : Adénosine monophosphate cyclique

AP-1 : *Activator protein 1* (Protéine activatrice 1)

AR: *Androgen receptor* (Récepteur de l'androgène)

ARID : *AT rich interaction domain* (Domaine d'interaction AT riche)

ARNm : Acide ribonucléique messenger

ATP : Adénosine triphosphate

CBP: *CREB binding protein* (Protéine de liaison à CREB)

CCND1 : Cycline D1

CENPA : *Centromere protein A* (Protéine A centromérique)

ChIP : *Chromatin immunoprecipitation* (Immunoprécipitation de la chromatine)

CoA : Coactivateur

COOH : Région carboxy-terminale

CoR : Corépresseur

CREB : Élément de liaison en réponse à l'AMPc

DBD : *DNA binding domain* (Domaine de liaison à l'ADN)

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

dMyc : Protéine codé par le gène Myc, similaire à l'oncogène viral myelocytose

dNTP : Déoxyribo nucléotides tri phosphate

DTT : Dithiothréitol

E. coli : *Escherichia coli*

E1 : Oestrone

E2 : Œstradiol

E3 : Œstriol

*EBAG9 : Estrogen Receptor Binding Site Associated Antigen 9*

*EDTA : Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid*

*EGTA : Ethylene glycol tetra acetic acid*

*ERE : Estrogen response element* (élément de réponse à l'œstrogène)

*ERs : Estrogen receptors* (Récepteurs de l'œstrogène)

*ER $\alpha$  : Estrogen receptor  $\alpha$*  (Récepteur de l'œstrogène  $\alpha$ )

*ER $\beta$  : Estrogen receptor  $\beta$*  (Récepteurs de l'œstrogène  $\beta$ )

*FSH : Follicle-stimulating hormone* (Hormone folliculo-stimulante)

*Gn-RH : Gonadotropin-releasing hormone* (Hormone gonadolibérine)

*GREB1 : Growth regulation by estrogen in breast cancer 1*

*GRIP1 : Glutamate receptor-interacting protein 1*

*GRP30 : G-protein coupled receptor 30* (Récepteur membranaire de l'œstrogène couplé à une protéine G)

*H1: Histone H1*

*H2A.X: Variant d'histone H2A, variant X*

*H2A.Z: Variant d'histone H2A, variant Z*

*H2A: Histone H2A*

*H2ABBD: H2A- bar-body-deficient*

*H2B : Histone H2B*

*H3 : Histone H3*

*H3.3 : Variant de l'histone H3, variant H3.3*

*H3K27: Lysine 27 de l'histone H3*

*H3K36 : Lysine 36 de l'histone H3*

*H3K4 : Lysine 4 de l'histone H3*

*H3K79 : Lysine 79 de l'histone H3*

*H3K9 : Lysine 9 de l'histone H3*

*H4 : Histone H4*

*H4K20 : Lysine 4 de l'histone H4*

*HAT : Histone acétyltransférase*

*HDAC : Histone déacétylase*

HELA : Cellules cancéreuses du donneur Henrietta Lacks  
 HMT : Histone méthyltransférase  
*IGFBP4* : *Insulin-like growth factor-binding protein 4*  
 Inr : Initiateur  
 JmjC : Domaine jumonji en C-terminal  
 JmjN : Domaine jumonji en N-terminal  
 K : Lysine  
 KDM1/LSD1 : *Lysine specific demethylase 1*  
 KDM5a : Lysine déméthylase 5a  
 KDM5b/PLU1 : Lysine déméthylase 5b  
 KDM5c/SMCX : Lysine déméthylase 5c  
 KDM5d/SMCY : Lysine déméthylase 5d  
 LB : *Lysogeny broth* ou milieu Luria Bertani  
 LBD : *Ligand binding domain* (Domaine de liaison du ligand)  
 LH : *Luteinizing hormone* (Hormone lutéinisante)  
 M : Molaire  
 MAPK : *Mitogen Activated Protein Kinase*  
 MCF-7 : *Michigan Cancer Foundation - 7*  
 me : Méthylation  
 me1 : Monométhylation  
 me2 : Diméthylation  
 me3 : Triméthylation  
 mg : Milligramme  
 ml : Millilitre  
 NH2 : Région amino-terminale  
 mM : Millimolaire  
 NaCl : Chlorure de sodium  
 NLS : *Nuclear Localization Signal* (région de localisation du signal nucléaire)  
 NMR : *Nuclear magnetic resonance* (résonance magnétique nucléaire)  
 ARN polII : ARN polymérase II  
 NP40 : Nonidet P-40

P : Phosphorylation

pb : Paire de bases

PBS : *Phosphate buffered saline* (Tampon phosphate salin)

PCR : *Polymerase Chain Reaction* (Réaction en chaîne par polymérase)

PHD : *Plant homeo domain*

PIC : *Pre-initiation complex* (complexe de préinitiation de la transcription)

PKC : Protéine kinase c

pRB: Protéine du rétinoblastome

R : Arginine

rbr-2 : *Retinoblastoma Binding protein 2* (protéine 2 liant le rétinoblastome)

RBTN2 : *Rhombotin-2* (protéine rhombotiné 2)

RIP140 : *Nuclear receptor-interacting protein 1*

RT-qPCR : *Reverse transcription- quantitative PCR* (Transcription inverse suivi d'une PCR en temps réel)

S: Serine

SRCAP : *Snf2-related CREBBP activator protein*

SWI/SNF : *Switch/Sucrose nonfermentable*

TBP : *TATA binding protein* (protéine de liaison à la boîte TATA)

TFF1 : *Trefoil factor 1* (Facteur en forme de trèfle 1)

TFIIA : *Transcription factor IIA* (facteur de transcription IIA)

TFIIB : *Transcription factor IIB* (facteur de transcription IIB)

TFIID : *Transcription factor IID* (facteur de transcription IID)

TFIIE : *Transcription factor IIE* (facteur de transcription IIE)

TFIIF : *Transcription factor IIF* (facteur de transcription IIF)

TFIIH : *Transcription factor IIH* (facteur de transcription IIH)

Tris : trishydroxyméthylaminométhane

TSS : *Transcription Start Site* (site de départ de la transcription)

Ub : Ubiquitination

UCSC : University of California, Santa Cruz

# **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1 Séquence des ARN interférants utilisés pour la déplétion de KDM5a</b>	<b>36</b>
<b>Tableau 2 Amorces utilisées pour les analyses d'expression, par RT-PCR, et de localisation par ChIP</b>	<b>40</b>
<b>Tableau 3 Liste des anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation de type Western et pour l'immunoprécipitation de la chromatine</b>	<b>42</b>

# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> Modèle de l’empaquetage de la chromatine	<b>3</b>
<b>Figure 2</b> La structure d’un nucléosome	<b>4</b>
<b>Figure 3</b> Les différents mécanismes utilisés par les déméthylases	<b>16</b>
<b>Figure 4</b> Domaine des protéines de la famille JARID1.	<b>18</b>
<b>Figure 5</b> Organisation des régions régulatrices d’un gène	<b>22</b>
<b>Figure 6</b> Formation du complexe de préinitiation	<b>23</b>
<b>Figure 7</b> Structure de la glande mammaire.	<b>34</b>
<b>Figure 8</b> Les rétroactions réglant la fonction ovarienne	<b>26</b>
<b>Figure 9</b> Les isoformes du récepteur de l’œstrogène et son organisation structurale	<b>29</b>
<b>Figure 10</b> Les différentes voies de signalisation cellulaire par les récepteurs de l’œstrogène.	<b>31</b>
<b>Figure 11</b> La déplétion par ARN interférants de KDM5a dans les cellules MCF-7.	<b>44</b>
<b>Figure 12</b> La déplétion de KDM5a n’affecte pas l’expression des autres déméthylases de la famille JARID1a.	<b>45</b>
<b>Figure 13</b> L’expression de KDM5a n’est pas régulée par l’œstrogène.	<b>46</b>
<b>Figure 14</b> La déplétion de KDM5a empêche l’activation des gènes ER dépendants.	<b>47</b>
<b>Figure 15</b> La localisation dans tout le génome de la protéine KDM5a	<b>49</b>
<b>Figure 16</b> La localisation de KDM5a à certains gènes ER dépendants	<b>50</b>
<b>Figure 17</b> La colocalisation de la protéine KDM5a avec H3K4me3 et l’ARN polII autour du TSS pour l’ensemble du génome	<b>52</b>
<b>Figure 18</b> L’analyse par CHIP des régions régulatrices du gène <i>TFF1</i> dans les cellules MCF-7	<b>53</b>
<b>Figure 19</b> La protéine KDM5a affecte le recrutement du ERα, de la ARN polII et des marques d’histones aux régions régulatrices du gène <i>TFF1</i> dans les cellules MCF-7.	<b>54</b>
<b>Figure 20</b> Sites de phosphorylation sur la protéine KDM5a.	<b>60</b>

# **CHAPITRE 1**

## **INTRODUCTION**

Chaque type de cellule diffère quelque peu des autres, soit par la taille, soit la forme ou encore par sa mobilité. Ces différences permettent aux cellules d'avoir des fonctions distinctes. En dépit des nombreuses variations, les cellules ont en commun plusieurs structures fondamentales. L'information génétique est codée sous forme de gènes composés d'un polymère appelé acide désoxyribonucléique (ADN). Le brin d'ADN est constitué de nucléotides. Les nucléotides sont composés d'un groupement phosphate, du désoxyribose et de monomères aussi appelées bases azotées : l'adénine, la thymine, la guanine et la cytosine (A, T, G, C). L'appariement entre les brins est possible grâce à la formation de paires de bases complémentaires A-T et G-C. Cet appariement se fait avec un angle, la structure tridimensionnelle donne une double hélice.

Chez les eucaryotes, dont fait parti l'humain, l'ADN est contenu dans le noyau. Selon le consortium international du séquençage du génome humain, le bagage génétique serait constitué de 20000-25000 gènes (2004). Ainsi, la taille du génome humain est approximativement de 3,2 milliards de paires de nucléotides totalisant environ 2 mètres d'ADN. Cette information qui représente environ 100 000 fois la taille de la cellule est contenu dans le noyau dont le diamètre est d'environ 5 $\mu$ m. De ce fait, l'empaquetage de l'ADN est essentiel dans l'architecture cellulaire.

### **1.1 La chromatine**

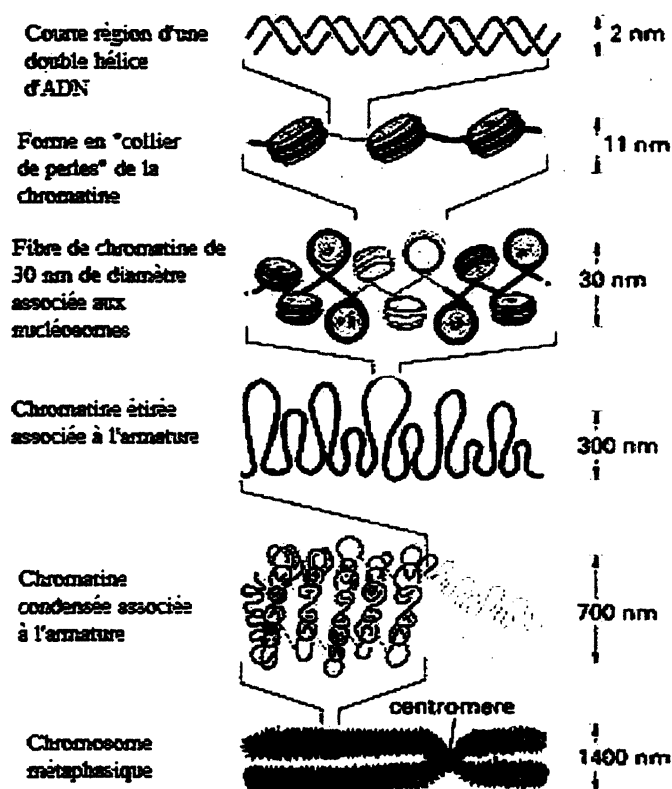
### 1.1.1 La structure et l'organisation de la chromatine

L'ADN est retrouvé dans le complexe nucléoprotéique, la chromatine, qui permet la compaction du matériel génétique et possède plusieurs niveaux d'organisation structurale (Figure 1). Le premier niveau est le nucléosome, formé par l'octamère d'histones de structure 2X (H2A, H2B, H3, H4) autour duquel s'enroule 147 paires de bases d'ADN. L'enroulement de l'ADN est maintenu grâce à des interactions électrostatiques entre les charges négatives des groupements phosphate de l'ADN et les charges positives des histones. Il existe cinq principaux types d'histones : H2A, H2B, H3, H4 et H1. Les histones dites de "cœur" correspondent aux histones H2A, H2B, H3 et H4. Ce sont des protéines d'environ 14 kDa, organisées en deux domaines distincts : une queue N-terminale, un domaine central et C-terminal. La queue N-terminale, peu structurée, est composée de 11 à 37 résidus d'acides aminés. Le domaine central et C-terminal adopte une structure particulière dite en "repliement d'histone" (ou "*histone fold*") (Figure 2) (Arents et al., 1991). Ce domaine est composé de trois hélices alpha reliées par des domaines en boucle.

En plus de la queue d'histone en N-terminale et le repliement d'histone, les histones H2A possèdent une queue en C-terminale. Les extrémités N-terminales et C-terminales surgissent à l'extérieur du nucléosome et possèdent plusieurs résidus lysine ou arginine. Ces extrémités sont connues pour subir des modifications post-traductionnelles qui vont agir sur la structure de la chromatine par la modification de l'interaction histone-ADN ou par le recrutement de protéines effectrices. L'histone de liaison H1 a une structure différente de celle des autres histones. Sa masse moléculaire est d'environ 21 kDa. Plusieurs variants de cette histone ont été isolés. Certains sont spécifiques de certains types cellulaires ou de stades de développement. La liaison de l'histone H1 est labile et très dynamique, elle ne reste liée que quelques minutes à un endroit donné. Le temps de résidence est diminué quand les histones "cœur" sont acétylées, ce qui suggère des taux



d'échange plus élevés dans des conditions où la chromatine est remodelée (Misteli et al., 2000).

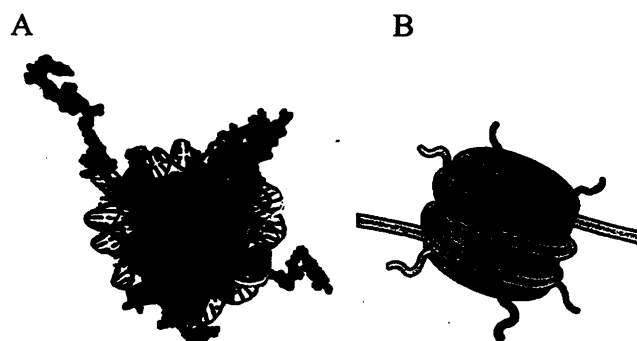


**Figure 1 Modèle de l'empaquetage de la chromatine**

La chromatine subit plusieurs étapes de condensation où le niveau de condensation le plus élevé donne place aux chromosomes métaphasiques. Le résultat obtenu montre que chaque molécule d'ADN a été empaquetée dans un chromosome mitotique 50000 fois plus court que la molécule déroulée. Figure adaptée de (Lodish, 2005)

Les nucléosomes forment le nucléofilament, appelé fibre de 11nm, qui ressemble à un collier de perles. Le nucléofilament subit à son tour un repliement pour former une fibre de 30 nm. Le mécanisme de repliement de cette fibre reste à déterminer (pour une revue, voir (Tremethick, 2007)). Deux principaux modèles ont été proposés pour la structure de cette fibre. La première hypothèse de repliement a été émise suite à l'observation, par microscopie électronique, d'une structure hélicoïdale de type solénoïde à une site d'initiation (Robinson and Rhodes, 2006). Le repliement en une hélice simple se fait en

une étape où les nucléosomes consécutifs seraient côte à côte dans la fibre qui s'enroule autour d'un axe virtuel et qui est stabilisée par l'histone de liaison H1 (Robinson et al., 2006).



**Figure 2 La structure d'un nucléosome**

A : La structure du nucléosome, vue de face, d'après les données de cristallographie aux rayons X. H2A est en jaune, H2B en rouge, H3 en bleu et H4 en vert. Le squelette du brin d'ADN est représenté en gris. B : illustration du nucléosome montrant les queues N-terminales des huit histones impliquées dans la condensation de la chromatine. Les queues C-terminales de l'histone H2A ne sont pas visibles. Adapté de (Graff et al., 2011)

En revanche, l'observation de la structure cristallographique a permis d'émettre une autre hypothèse selon laquelle le repliement du nucléofilament conduirait à l'obtention d'une structure hélicoïdale en forme de zigzag à deux sites d'initiation où les nucléosomes consécutifs se font face (Schalch et al., 2005). Ces deux hypothèses suggèrent que la chromatine condensée pourrait être dynamique puisque les deux formes ont pu être observées. Cet arrangement subit à son tour un repliement d'ordre supérieur qui conduit ensuite à la formation des chromosomes épais et denses, observables lors de la mitose.

Ces multiples niveaux d'organisation du génome définissent différentes formes de chromatines, avec des propriétés physiques et biochimiques distinctes. Dans les cellules eucaryotes, il existe deux formes de condensation de la chromatine : l'euchromatine et l'hétérochromatine. L'euchromatine, la forme décondensée active, est caractérisée par la présence de nombreux gènes. Son organisation s'effectue de manière différentielle en fonction de l'état transcriptionnel. Dans sa forme inactive, l'euchromatine peut être condensée et forme l'hétérochromatine facultative. Cette structure diffère de l'hétérochromatine constitutive qui est caractérisée par des régions pauvres en gènes se

situant autour des centromères et des télomères (Craig, 2005). Récemment, des études chez la drosophile réalisées par l'équipe de Fillion ont montré qu'il existe cinq types de chromatine (Fillion et al., 2010). L'euchromatine serait subdivisée en deux types distincts soit l'euchromatine associée à la réplication de l'ADN et celle associée à l'élongation et la réparation de l'ADN. De plus, cette équipe a montré la présence d'un troisième type d'hétérochromatine soit l'hétérochromatine liée au développement. Selon les auteurs, il serait possible de retrouver ces cinq types de chromatine chez les mammifères mais ils ne l'ont pas démontré.

Les fonctions de la chromatine vont au-delà du procédé d'empaquetage de l'ADN. En effet, la présence de nucléosomes sur l'ADN a des répercussions sur différents processus cellulaires, tels que la transcription, la réplication, la différenciation et la réparation de l'ADN. Le niveau élevé de compaction de la chromatine en fait une barrière répressive à la transcription en masquant les séquences d'ADN importantes pour la régulation. Différents mécanismes sont employés par la cellule afin de réguler l'expression des gènes, au moyen notamment de la variation de son degré de condensation.

### **1.1.2 Les mécanismes de remodelage de la chromatine**

La transcription d'un gène peut nécessiter un réarrangement de la structure chromatinienne afin d'exposer les séquences promotrices ou de faciliter la progression des enzymes. Les changements au niveau de la structure de la chromatine requièrent l'intervention de complexes multiprotéiques agissant sur l'architecture du nucléosome. Ces mécanismes peuvent être groupés en trois classes distinctes, soit : les mécanismes de remodelage dépendant de l'ATP-, l'incorporation de variants d'histones et les mécanismes permettant les modifications post-traductionnelles des histones (Saha et al., 2006).

### 1.1.2.1 Les mécanismes dépendant de l'ATP

Les complexes de remodelage de la chromatine dépendant de l'ATP agissent sur l'organisation de la chromatine en modifiant la position ou la stabilité d'un nucléosome. À l'aide d'une sous-unité catalytique appartenant à la superfamille ATPases SNF2, ce mécanisme permet de réguler des processus cellulaires tels que la transcription, la réparation de l'ADN, la réplication et la recombinaison. Les mécanismes dépendant de l'ATP sont subdivisés en cinq classes, basées sur l'identité de la sous-unité ATPases, soit : SWI/SNF, ISWI, Mi-2/NURD, INO80 et SWR1 (Bao and Shen, 2007; Eberhardter and Becker, 2004). Le complexe le mieux caractérisé est SWI/SNF (Decristofaro et al., 2001; Gutierrez et al., 2007; Jerzmanowski, 2007; Letimier et al., 2007; Osley et al., 2007; Quinn et al., 1996; Sudarsanam and Winston, 2000; Wilson et al., 1996). Ce complexe dissocie l'ADN lié aux nucléosomes de façon transitoire, ce qui résulte en un « glissement » du nucléosome sur l'ADN. Ce mécanisme facilite la fixation des facteurs de transcription à leurs sites spécifiques sur l'ADN. Par ailleurs, les complexes SWI/SNF ont été démontrés pour jouer un rôle important lors de l'activation et la répression des gènes régulés par les récepteurs nucléaires, tels que celui du ER $\alpha$  (Belandia et al., 2002; Muchardt and Yaniv, 1999; Yoshinaga et al., 1992). En effet, des complexes SWI/SNF peuvent également intervenir lors de la répression des gènes par l'exposition des queues d'histones aux protéines inhibitrices telles que les déacétylases (Ranjana W. Gunawardena, 2007).

De plus, il a été démontré que le complexe contenant SWR1 chez la levure peut affecter l'intégrité de l'octamère d'histone et ainsi favoriser l'échange pour des variants des histones canonique (Mizuguchi et al., 2004). Deux orthologues de ce complexe ont été identifiés chez les mammifères, le complexe « *Snf2-related CBP activator protein* » (SRCAP) (Johnston et al., 1999; Ruhl et al., 2006) et p400 (Gevry et al., 2007). Ils permettent tout les deux l'incorporation d'un variant de l'histone H2A, H2A.Z.

### **1.1.2.2 L'incorporation de variants d'histones**

Chez les eucaryotes supérieurs, il existe de très nombreux variants d'histones dont certains sont spécifiques à un type cellulaire et sont parfois présents seulement à certaines étapes du développement. Les variants d'histones sont des isoformes non alléliques des histones canoniques et se distinguent par des différences subtiles ou par des altérations significatives qui changent la nature de l'histone et modifient l'arrangement de la chromatine. Les complexes protéiques de remodelage de la chromatine qui dépendent de l'ATP sont capables d'échanger une histone canonique contre un variant afin de conférer de nouvelles fonctions à la chromatine (Jin *et al.*, 2005).

#### **1.1.2.2.1 Les variants de l'histone H2A**

L'histone canonique H2A possède de nombreux variants très diversifiés, H2A.X, H2A.Z, macroH2A et « H2A-bar-body-deficient » (H2ABbd). Tous ces variants sont impliqués dans divers processus cellulaires. Les variants les mieux caractérisés sont H2A.Z et H2A.X.

Le variant H2A.Z constitue 10 % des histones H2A (Redon C, 2002). Ce variant est impliqué lors de la régulation de l'expression des gènes. Les données cristallographiques obtenues par Suto *et al.* (Suto et al., 2000) montrent que l'enroulement de l'ADN autour de l'octamère d'histones contenant H2A.Z ne serait pas modifié. Cependant, l'incorporation de H2A.Z déstabiliserait l'association des dimères (H2A.Z-H2B) et (H3-

H4) ce qui pourrait faciliter l'accessibilité de la chromatine à des facteurs de transcription. Des expériences d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) montrent un défaut de recrutement de certaines protéines de la machinerie transcriptionnelle dans des conditions physiologiques pourtant favorables à l'activation de ces gènes chez les levures délétées de H2A.Z (Adam et al., 2001; Larochelle and Gaudreau, 2003; Santisteban et al., 2000). Son rôle lors de la répression est également connu (Dhillon and Kamakaka, 2000). Chez les mammifères, la présence du variant H2A.Z peut également avoir un effet activateur (Gevry et al., 2009) ou répresseur (Gevry et al., 2007) sur la transcription. De plus, il est connu que H2A.Z et p400 sont essentiels pour l'activation des gènes qui sont régulés par le récepteur à l'œstrogène  $\alpha$  (Gevry et al., 2009).

H2A.X est retrouvé chez les eucaryotes supérieurs. La sérine S139 de son extrémité C-terminale peut être phosphorylée à la suite de certains signaux cellulaires (Redon et al., 2002). La forme phosphorylée  $\gamma$ H2A.X est impliquée dans les processus de réparation des bris d'ADN double brins (Redon et al., 2002) et dans le processus de l'apoptose (Lu et al., 2006). De plus, chez la souris, H2A.X est requis lors de la condensation de la paire de chromosomes X et Y lors de la méiose (Fernandez-Capetillo et al., 2003). Récemment, Andang *et al.* (Andang et al., 2008) ont montré son rôle dans la prolifération cellulaire, et ce, indépendamment des dommages à l'ADN.

#### **1.1.2.2.2 Les variants de l'histone H3**

On connaît quatre isoformes de l'histone H3, CENP-A, H3.1t, H3.1, H3.2, H3.3, CENP-A et H3.3 étant les plus étudiées. Des études récentes ont montré que H3.3 est présent aux régions actives pour la transcription (Ahmad and Henikoff, 2002). Par contre, l'histone CENPA est associée à la formation des centromères et il est connu qu'un défaut dans son expression permet l'étalement sur l'ensemble du chromosome (Sullivan et al., 1994).

### **1.1.2.3 Les modifications post-traductionnelles des histones**

Les extrémités N-terminales des histones émergent de la surface du nucléosome et sont les cibles de nombreuses modifications post-traductionnelles. Celles-ci sont connues depuis de nombreuses années (Allfrey et al., 1964; Bohm et al., 1980). Ces modifications ont un impact sur les mécanismes de régulation transcriptionnelle en modulant le niveau de compaction de la chromatine. Ces modifications sont catalysés par des enzymes spécifiques sur des résidus précis, soit les résidus sérines (S), thréonines (Thr) arginines (R) et lysines (K) (Ruthenburg AJ, 2007).

Les modifications post-traductionnelles les plus étudiées sont la méthylation (me), l'acétylation (ac), l'ubiquitination (ub) et la phosphorylation (p). Ces modifications peuvent faire varier la charge des résidus de la queue d'histones et affecter les interactions ADN/histones ou histones/histones ou permettre le recrutement de protéine enzymatique. De surcroît, l'accumulation d'évidences scientifiques suggère que la combinaison des modifications ayant lieu sur les nucléosomes, avec la présence ou l'absence de variants d'histones, contribuerait à encoder l'information épigénétique qui régule l'expression des gènes (Nightingale, 2006). Les différentes combinaisons de modifications, communément appelées marques d'histones, permettent le recrutement de protéine et leur association à des processus biologiques spécifiques. Elles ont conduit au concept du code des histones proposé par Dave Allis et ses collaborateurs (Jenuwein and Allis, 2001; Strahl and Allis, 2000). Ce code serait lu par des protéines régulatrices et traduit en un état chromatinien particulier : actif, permissif, restrictif ou inactif. Les changements des états de transcription des gènes sont en général réversibles et sont portés par des modifications dites épigénétiques. L'épigénétique peut être définie comme le contenu des informations qui augmente la complexité du génome et n'impliquant aucun changement de la séquence d'ADN.

#### **1.1.2.3.1 La phosphorylation et l'ubiquitination des histones**

La phosphorylation et l'ubiquitination des histones sont peu étudiées comparativement aux autres modifications post-traductionnelles. La phosphorylation a lieu sur les résidus sérine et thréonine. Celle-ci est catalysée par des kinases et est enlevée par des phosphatases. Le variant H2A.X est phosphorylé à la suite de certains signaux cellulaires (Redon et al., 2002) et est impliqué dans les processus de réparation des cassures d'ADN double brins (Redon et al., 2002) et dans le processus de l'apoptose (Lu et al., 2006). L'ubiquitination a lieu sur les résidus lysines. Le rôle de l'ubiquitination des histones est de marquer ces protéines pour la dégradation via le protéasome. Il a été montré que les histones H3 et H4 peuvent être ubiquitinées, ce qui leur permet d'intervenir lors de la réparation de l'ADN après des irradiations aux ultraviolets (Wang et al., 2006).

La découverte de protéines pouvant retirer les modifications post-traductionnelles des histones a permis de démontrer que ces modifications sont réversibles et agissent sur l'organisation des différentes étapes nécessaires à la transcription en modifiant la structure chromatinienne.

#### **1.1.2.3.2 L'acétylation des histones**

L'acétylation des histones est catalysée par des enzymes nommées histones acétyltransférases (HAT) au niveau des résidus lysines. Cette réaction est réversible par l'effet des enzymes histones déacétylases (HDAC) (Brownell et al., 1996; Carmen et al., 1996; Rundlett et al., 1996). L'acétylation des histones est associée à l'activation de la transcription étant donné son effet déstabilisateur sur le nucléosome (Mellor, 2005). En effet, l'acétylation des résidus lysines neutralise leur charge positive et affaiblit le contact avec la molécule d'ADN chargée négativement (Mellor, 2005). Cette déstabilisation du nucléosome expose l'ADN à la machinerie transcriptionnelle. D'ailleurs, les complexes protéiques possédant une activité acétyltransférase comme CBP et p300 sont recrutés par



des facteurs de transcription et induisent le relâchement de la chromatine, ce qui favorise l'activité transcriptionnelle (Chakravarti et al., 1996; Mellor, 2005; Verdone et al., 2005). Le recrutement de ces protéines est dû à la présence d'un domaine de reconnaissance des histones acétylées, les bromodomaines (Zeng et al., 2008) . À l'inverse, le recrutement de complexes ayant une activité désacétylase, tels Sin3, SMRT/NcoR ou CoREST, va conduire à la formation d'une chromatine condensée non permissive à la transcription (van Oevelen et al., 2008; Verdone et al., 2005; You et al., 2001). L'acétylation/désacétylation constitue un mécanisme réactif qui permet la régulation de la transcription. Cependant, ce système ne fonctionne pas seul. En effet, la désacétylation des histones fonctionne en coopération avec la méthylation des histones (Jenuwein and Allis, 2001).

#### 1.1.2.3.3 La méthylation des histones

Afin d'ajouter à la complexité de la régulation transcriptionnelle, le résidu lysine peut être mono, di ou triméthylé (me1, me2, me3). La nomenclature utilisée pour l'identification des résidus est constituée, dans l'ordre, du nom de l'histone, du résidu modifié, de la modification effectuée et du nombre de groupement. Par exemple, la triméthylation de l'histone H3 sur la lysine 4 s'écrit H3K4me3.

Les histones peuvent être méthylées au niveau de résidus lysine ou arginines par des enzymes nommées histones méthyltransférases (HMT) qui ont été découvertes en 2000 (Rea et al., 2000). On regroupe ces enzymes en trois familles de protéines, celles contenant des domaines SET (pour Su(var)3-9 *Enhancer-of-zeste* *Tritorax*), celle sans domaine SET, soit DOT1 (pour *disruptor of telomeric silencing*)/DOT1L (pour *DOT like*) (Lachner and Jenuwein, 2002; Min et al., 2003; Rea et al., 2000) et la famille PRMT (pour *Protein arginine MethylTransferase*). Les HMT les plus étudiées sont celles de la famille SET qui comprennent les protéines polycomb (PcG), les protéines du groupe

tritorax (trxG) et les protéines MLL 1-4 (pour *Mixed-Lineage-Leukemia*). Les protéines PcG et trxG sont des importants régulateurs des gènes homéotiques où les PcG sont répresseurs et les trxG sont activateurs (Kuzmichev et al., 2002; Pasini et al., 2008; Shen et al., 2009; Yu et al., 1995). Les protéines PcG agissent sur l'état de la chromatine sous la forme de larges complexes multimériques, les *Polycombs repressive complex* (PRC). Ces complexes se fixent sur l'ADN au niveau de séquences régulatrices appelées PcG response elements (PRE). Ces protéines forment deux complexes, le PRC1 et le PRC2. Le complexe PRC2 est connu pour ajouter trois groupements méthyles sur le résidu H3K27 (Cao et al., 2002). De son côté, PRC1 est connu pour maintenir l'état répressif de la chromatine en empêchant la liaison des complexes de remodelage de la chromatine (Cao et al., 2002).

Contrairement à l'acétylation, la méthylation ne modifie pas la charge des résidus lysines ou arginines du nucléosome. Cependant, il a été montré que la méthylation des résidus de la queue des histones permet le recrutement de protéines possédant des domaines spécialisés de reconnaissance la méthylation. Il s'agit des domaines *chromo-like* (chromo, tudor, MBT) ou les « *plant homeo domain* » (PHD) (Jenuwein and Allis, 2001). Les protéines qui possèdent ces domaines peuvent être recrutées sur le résidu méthylé et affecter la structure chromatinienne (Taverna et al., 2007). Par conséquent, le résidu, son emplacement, le nombre de groupement méthyle ainsi que la combinaison avec d'autres modifications post-traductionnelles déterminent l'effet sur la transcription par le recrutement de ces protéines. Certaines marques sont associées à la chromatine active, l'euchromatine, alors que d'autres sont associées à la forme répressive plus compacte, l'hétérochromatine. Généralement, les marques H3K9me3, H3K27me3 et H4K20me3 sont reliées à l'hétérochromatine et au silençage des gènes alors que la méthylation de H3K4me3, H3K4me2, H3K36me2 H3K79me3 est associée à l'euchromatine (Martin and Zhang, 2005; Pedersen and Helin).

La méthylation de H3K4 a été observée pour la première fois chez les truites (Honda et al., 1975). Dans des études ultérieures, elle a été retrouvée dans l'euchromatine et associée à une transcription active dans plusieurs espèces eucaryotes (Martin and Zhang, 2005). Il est connu que la méthylation de H3K4 est utilisée comme plate-forme pour les complexes de remodelage de la chromatine comme la protéine CHD1, la protéine TFIIA, la protéine BPTF, une sous-unité du complexe de remodelage de la chromatine NURF, et la protéine ING, associée avec des complexes d'histone acétyltransférase et déacetylase (Li et al., 2006; Pray-Grant et al., 2005; Sims et al., 2005; Sims and Reinberg, 2006; Taverna et al., 2007).

On observe un patron distinct de la localisation des marques H3K4. Globalement, H3K4me3 est associée aux régions 5' des gènes actifs (Barski et al., 2007; Guenther et al., 2007). H3K4me2 montre un patron plus flou qui peut être indépendant du site d'initiation de la transcription (TSS) (Keith Orford, 2008; Ruthenburg AJ, 2007). Généralement, H3K4me2 est retrouvée dans la région codante et pourrait participer à l'activation transcriptionnelle en bloquant la déacétylation des régions concernées (Bernstein et al., 2002). Cependant, la méthylation de H3K4 est également retrouvée dans des gènes inactifs (Orford et al., 2008). En plus de son rôle lors de la transcription, ces observations suggèrent que la méthylation de H3K4 pourrait jouer un rôle dans le maintien d'un état bivalent ou « *poised* » de la chromatine (Schneider et al., 2004). D'ailleurs, il est connu que la méthylation de H3K4 arrive après l'assemblage du complexe de préinitiation, suggérant que la méthylation n'est pas suffisante pour initier la transcription. Cependant, elle serait impliquée dans des processus tels que l'élongation, la maturation de l'ARNm ou le maintien de l'expression génique (Pavri et al., 2006). Par conséquent, la méthylation de H3K4 pourrait faciliter la transcription par le recrutement de complexe de remodelage de la chromatine et de modification des histones ou empêcher les corépresseurs de lier la même région de la chromatine.

#### **1.1.2.3.4 La déméthylation des histones**

Pendant plusieurs années, la méthylation des histones a été considérée comme une marque épigénétique stable et irréversible, étant donné l'incapacité d'identifier une protéine possédant une activité histone déméthylase. À l'époque, deux théories ont été émises quant au changement du niveau de méthylation des histones dans la chromatine.

La première suggérait que les queues des histones étaient coupées et remplacées (Allis et al., 1980) ou que les histones étaient remplacées par des variants possédant la méthylation désirée (Ahmad and Henikoff, 2002; Briggs et al., 2001; Johnson et al., 2004). Cette théorie était appuyée par des études de demi-vie de la méthylation des histones qui ont montré sa similitude avec la demi-vie de l'histone elle-même (Byvoet et al., 1972). Toutefois, ce mécanisme ne permet pas d'expliquer la régulation dynamique de la méthylation essentielle pour la régulation de la transcription.

La deuxième théorie suggère l'existence de protéines pouvant retirer les groupements méthyle sur les résidus R et K des queues d'histones. Les travaux de Paik et Kim (Kim et al., 1964) ont été les premiers à démontrer qu'une enzyme pouvait agir sur les résidus méthylés. Cette équipe a également isolé l'activité qui permettait la déméthylation des histones sans jamais en identifier la protéine responsable (Paik and Kim, 1973, 1974). Ce n'est qu'en 2004 que la première protéine ayant une activité histone déméthylase (KDM) a été identifiée, la protéine LSD1/KDM1A (*lysine specific demethylase 1*) (Shi et al., 2004). Cette protéine possède spécifiquement la capacité de retirer les groupements méthyle sur H3K4 (H3K4me1/me2), ce qui lui confère un rôle de corépresseur de la transcription bien que son rôle en tant que coactivateur (CoA) a également été démontré (Shi et al., 2004). En effet, LSD1 peut agir sur H3K9 (H3K9me1/me2) lorsqu'elle interagit avec les récepteurs des androgènes (AR) et les ERs. Le rôle de la protéine est alors modifiée, passant de corépresseur (CoR) à CoA de la transcription quant aux gènes sous le contrôle des AR et ERs (Metzger et al., 2005).

#### 1.1.2.3.5 Les classes de déméthylases

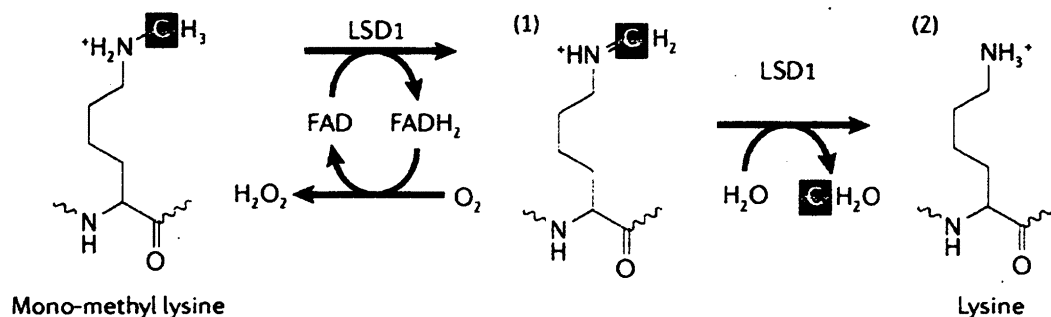
À la suite de la découverte de cette protéine, les recherches se sont accrues afin d'identifier de nouvelles KDM. Depuis, plusieurs KDM ont été identifiés puis regroupés en deux classes selon le cofacteur utilisé pour la réaction enzymatique (Klose et al., 2006; Tsukada et al., 2006; Yamane et al., 2006) (Figure 3).

La première classe, restreinte aux protéines LSD1 et LSD2, utilise une réaction oxydative qui nécessite l'usage de la flavine (FAD) comme cofacteur et crée un ion iminium ( $[R_1R_2C=NR_3R_4]^+$ ). Cet ion est spontanément hydrolysé et produit une molécule de formaldéhyde. La différence majeure entre ce mécanisme et celui de la deuxième classe est l'utilisation d'un hydrogène comme source de proton afin de retirer les groupements méthyles des résidus lysines. Lorsqu'elle est triméthylé, la lysine ne possède pas d'hydrogène sur son azote. De ce fait, les enzymes de la première classe sont incapables d'enlever les groupements méthyles lorsque le résidu lysines est triméthylé.

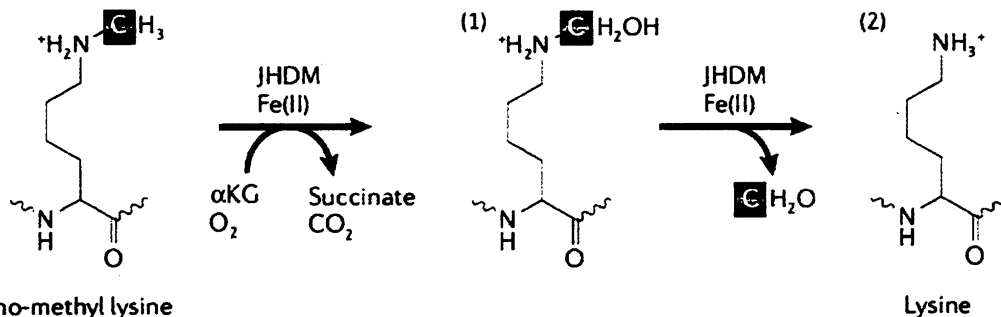
La seconde classe est beaucoup plus vaste et regroupe les protéines possédant un domaine Jumonji C (JmJc), lequel utilise le fer Fe (Fujii et al.) et  $\alpha$ -ketoglutarate ( $\alpha$ KG) comme cofacteurs (Tsukada et al., 2006). Plusieurs protéines chez de nombreuses espèces telles que les bactéries, les champignons, les plantes et les animaux possèdent un domaine JmJc (Balciunas and Ronne, 2000). Basé sur l'homologie de la séquence du domaine JmJc et des autres motifs retrouvés sur la protéine, les KDM qui possèdent un domaine JmJc ont été classées selon différents groupes. Bien que les fonctions des KDM ne soient pas encore bien caractérisées, ces enzymes ont un impact sur la structure de la chromatine et la régulation de la transcription.

Chez les mammifères, on retrouve quatre membres de la famille JARID1, soit : JARID1a/RBP2/KDM5a, JARID1b/PLU1/KDM5b, JARID1c/SMCX/KDM5c et JARID1d/SMCY/KDM5d. Des orthologues de ces protéines ont été identifiés chez les eucaryotes inférieurs tels que *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* et *Saccharomyces cerevisiae*, lesquels correspondent respectivement à Lid, rbr-2 et jhd2p.

#### A. LSD1



#### B. JHDM



**Figure 3 Les différents mécanismes utilisés par les déméthylases**

A. LSD1 (*lysine specific demethylase 1*) utilise la flavine (FAD) comme cofacteur pour retirer la mono et la dimethylation de la lysine par une réaction d'oxydation amine. La perte d'un groupement méthyle d'une lysine monométhylée conduit à un intermédiaire imine (1), lequel est hydrolysé pour former un formaldéhyde par un procédé non-enzymatique (2). B. JHDMs (*JmjC-domain-containing histone demethylases*) possède un mécanisme qui utilise les cofacteurs Fe(Fujii et al.) and  $\alpha$ KG pour retirer les groupements méthyle sur les lysines. La déméthylation produit une hydroxylation directe du groupement méthyle (1), lequel produit un hydroxyméthyle instable et donne spontanément un formaldéhyde (2) (modifié de Klose et al. 2006).

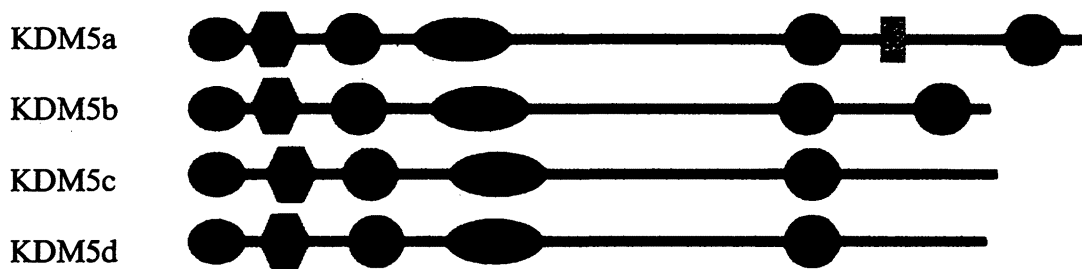
#### 1.1.2.3.6 La famille JARID1

Il a aussi été démontré que l'activité déméthylase est exclusive à H3K4me3 (Secombe and Eisenman, 2007). Par contre, chez les mammifères, il a été démontré *in vivo* que tous les membres de la famille JARID1 agissent également sur H3K4me2 (Christensen et al., 2007; Iwase et al., 2007; Lee et al., 2007; Yamane et al., 2007). Bien que les membres de cette famille agissent sur la même marque d'histone, chacun de ses membres possède des fonctions physiologiques différentes. En effet, il a été montré que KDM5a est impliqué dans le contrôle de la différenciation cellulaire (Benevolenskaya et al., 2005). De plus, il est connu que la protéine KDM5a est un important régulateur des gènes homéotiques (Christensen et al., 2007). D'ailleurs, une déplétion complète de la protéine KDM5a chez les souris résulte en des troubles de comportement et une polynucléose neutrophile. (Klose et al., 2007). La protéine KDM5b est connue pour être surexprimée dans 90% des cancers du sein, et ce, indépendamment du stade de développement. Par contre, son rôle dans l'établissement du cancer du sein n'a pas été démontré. KDM5c, qui est codé sur le chromosome x, a été identifiée comme un gène causal du retard mental lié à l'X (Jensen et al., 2005; Tzschach et al., 2006). Finalement, KDM5d, qui est codé sur le chromosome Y, est très peu étudié. Récemment, son interaction avec les protéines Ring6a/MBLR a été démontrée, ce qui suggère son implication pour l'initiation de la transcription (Lee et al., 2007).

#### **1.1.2.3.7 Les domaines fonctionnels de la famille JARID1**

Jusqu'à ce jour, plusieurs domaines fonctionnels communément retrouvés chez les régulateurs de la transcription, incluant le domaine JmjN, le domaine JmjC, le domaine ARID/Bright, le domaine en doigt de zinc C5HC2 et plusieurs PHD ont été identifiés à l'aide d'outils informatiques (Bateman et al., 2000; Corpet et al., 2000; Hofmann et al., 1999) (Figure 4). Les protéines de la famille JARID1 possèdent une structure bipartite qui contient un domaine très conservé à l'extrémité amino-terminale, le domaine JmjN. Ce domaine serait impliqué dans le maintien de la structure du domaine JmjC et de son activité déméthylase (Chen et al., 2006). Les protéines de la famille JARID1 possèdent

un domaine riche en AT, nommé ARID, qui permet la liaison à l'ADN et à un ou plusieurs domaines PHD dont l'importance a été montrée pour l'activité déméthylase de JHDM2A (Yamane et al., 2006). De plus, ce domaine est commun à plusieurs protéines nucléaires telles que les facteurs de transcription CoA p300 et CBP ou des corépresseurs tels que les déméthylases appartenant à la famille JARID1 (Aasland et al., 1995). Bien que les membres de la famille JARID1 possèdent plus d'un domaine PHD, ceux-ci semblent avoir des rôles distincts. En effet, il a été démontré pour KDM5a que seulement le dernier PHD est nécessaire à la déméthylation de H3K4me3/2. Également, pour SMCX, seulement un des deux domaines PHD reconnaît H3K9me3 (Iwase et al., 2007). Il a aussi été montré que le domaine PHD de KDM5D est non essentiel à son activité déméthylase (Lee et al., 2005) appuyant ainsi la théorie que les PHD ont des fonctions distinctes. Puisque les domaines PHD sont connus pour lier spécifiquement les histones méthylées, leurs nombres au sein des membres de la famille JARID1 pourraient être importants pour la régulation par JARID1.



**Figure 4 Structure des protéines appartenant à de la famille JARID1.**

Représentation schématique des membres de la famille JARID1, KDM5a, KDM5b, KDM5c et KDM5d. Les domaines Jmj qui possèdent l'activité catalytique sont représentés par les ovales vert et rouge. Le domaine ARID qui permet la liaison à l'ADN est représenté par hexagone mauve. Les protéines KDM5a et KDM5b possèdent trois domaine PHD alors que les protéines KDM5c et KDM5d en possèdent deux. Les domaines PHD nécessaire à la liaison aux histones méthylées sont représentés par les cercles bleus. La protéine KDM5a possède un domaine interaction aux protéines qui est représenté par le rectangle jaune. Modifié de (Christensen et al., 2007)



#### 1.1.2.3.8 La protéine KDM5a

La protéine KDM5a est une phosphoprotéine nucléaire contenant 1722 acides aminés initialement identifiés comme pouvant se lier à la protéine du rétinoblastome (pRB) (Defeo-Jones D, 1991; Fattaey et al., 1993), d'où sa première appellation RBP2. Cette interaction est possible grâce au motif LXCXE (LC, Figure 4) qui lui permet également d'interagir avec les protéines p107 et TBP (Fattaey et al., 1993; Kim et al., 1994). Il est bien établi que pRB joue un rôle important dans la prolifération cellulaire, le développement et la différenciation cellulaire. Par conséquent, à ce jour, de nombreuses études ont montré son rôle de répresseurs à l'aide des modèles de différenciation cellulaire (Benevolenskaya et al., 2005; Christensen et al., 2007; Pasini et al., 2008). En effet, une perte de KDM5a lors des processus de différenciation cellulaire montre une augmentation du niveau H3K4me2/me3 (Christensen et al., 2007) et de la transcription des gènes cibles. De plus, des études sur les cellules humaines HELA ont montré son recrutement par la protéine MRG15, un composant du complexe mSin3/HDAC, afin de contrôler le niveau de méthylation sur H3K4 dans la région transcrite (Hayakawa et al., 2007). En outre, Van Oevelen et ses collègues (van Oevelen et al., 2008) ont montré que 58 % des gènes liés par Sin3 sont également liés par KDM5a à une région où peut se lier E2F, un facteur de transcription impliqué dans la différenciation cellulaire. Les auteurs suggèrent que le complexe Sin3-HDAC et KDM5a joue un rôle coopératif lors de la répression des gènes de la différenciation cellulaire par la déacétylation, la déméthylation et le repositionnement de nucléosomes. En accord avec ces observations, Lopez-Bigas et ses collaborateurs (Lopez-Bigas et al., 2008) ont montré son implication, dans tout le génome, pour le contrôle de deux classes de gènes, soit des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et d'autres impliqués pour la fonction de la mitochondrie et le métabolisme ARN/ADN. D'ailleurs, la même équipe a démontré qu'une altération de l'expression de KDM5a conduit à un défaut de la mitochondrie dans les cellules humaines. Ces résultats montrent que les effets de cette protéine vont au-delà des processus de différenciation cellulaire. En effet, une étude récente dans les cellules de mammifère a montré l'implication de KDM5a dans la voie de signalisation de Notch qui

intervient pour la communication cellule-cellule afin de réguler plusieurs processus fondamentaux tels que la différenciation cellulaire, le développement, la prolifération cellulaire ou la mort cellulaire (Liefke et al., 2010).

Bien que toutes ces études montrent le rôle corépresseur de KDM5a, il est maintenant connu que cette protéine joue un rôle comme CoA en présence de la protéine pRB (Benevolenskaya EV, 2005). Également, il a été montré que KDM5a agirait comme CoA pour la protéine rhombotin-2 (RBTN2), un proto-oncogène impliqué dans le processus de l'érythropoïèse et la formation des lymphocytes T (Mao, 1997). D'ailleurs, KDM5a interagit avec plusieurs récepteurs nucléaires, dont ER, suggérant son action comme CoA de la transcription (Chan and Hong, 2001). De plus, son homologue chez la drosophile, la protéine *lid*, a été montré pour interagir avec dMyc qui agit comme un CoA au niveau des gènes cibles de dMyc par cette interaction (Secombe and Eisenman, 2007). La bivalence observée lors de la régulation de la transcription par KDM5a suggère que la protéine pourrait utiliser différents mécanismes d'action. En effet, en plus des nombreuses interactions avec d'autres protéines, il a été montré que la protéine KDM5a peut lier directement l'ADN via son domaine ARID (Tu et al., 2008). La structure de ce domaine a été élucidée par spectroscopie NMR et sa séquence a été confirmée par mutagenèse dirigée. En effet, suite à l'induction de mutations volontaires dans la séquence, l'équipe de Shengjiang Tu a permis d'établir son implication dans la liaison de la protéine au motif consensus CCGCCC sur l'ADN (Tu et al., 2008). De plus, la présence de la protéine KDM5a a été observée par ChIP dans la région promotrice de plusieurs gènes (Benevolenskaya et al., 2005; Christensen et al., 2007; Klose et al., 2007). Par conséquent, la protéine KDM5a est impliquée dans le contrôle de l'expression génique, en tant que CoA ou corépresseur de la transcription.

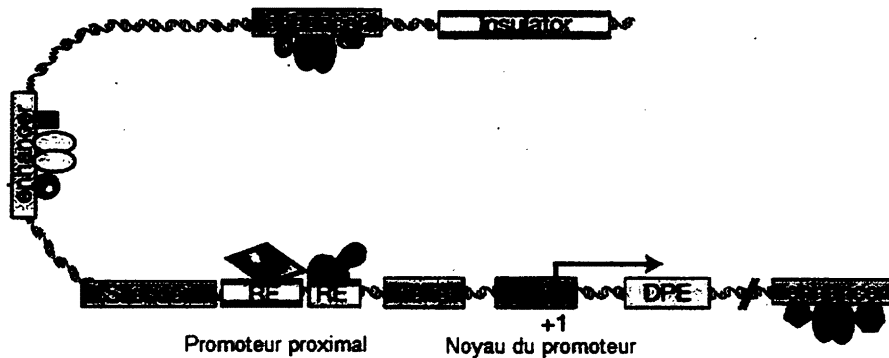
## 1.2 La transcription

On trouve, chez les eucaryotes, de nombreux complexes protéiques qui font partie intégrante des mécanismes de régulation de l'expression des gènes. L'initiation de la transcription résulte en l'interaction de différents complexes multiprotéiques CoAs, les complexes de remodelage de la chromatine, les complexes permettant l'acétylation des histones et un complexe médiateur. Ces complexes permettent le recrutement de la machinerie transcriptionnelle à différentes séquences régulatrices : promoteur minimal, promoteur proximal et éléments régulateurs distants (*enhancer*) (figure 5 (Levine and Tjian, 2003)).

Le promoteur minimal est une structure modulaire située autour du site d'initiation de la transcription (TSS ou +1). En plus de ce site bien défini, le promoteur minimal est constitué de la boîte TATA, de l'élément initiateur (Inr), les éléments de reconnaissance du facteur de transcription TFIIB (*Transcription factor II B*) (BRE pour TFIIB *Recognition Element*) et la séquence DPE (pour *Dowstream Promoter Element*) (Deng and Roberts, 2005; Levine and Tjian, 2003). La boîte TATA a été nommée ainsi en raison de sa séquence consensus TATAAA. Bien qu'elles ne sont pas toujours présentes (Sandelin et al., 2007; Smale, 2001), ces séquences, fournissent des indications pour l'assemblage du complexe de préinitiation de la transcription (PIC) en permettant la liaison de la protéine TBP (TATA *binding protein*) (Figure 6). La région proximale du promoteur est localisée à moins de 200 pb en amont du promoteur minimal. Elle contient habituellement des sites de liaison pour les facteurs de transcription et permet la modulation de l'activité du noyau du promoteur.

Les éléments régulateurs peuvent être situés à plusieurs kilobases en amont ou en aval du promoteur. Ils fixent des protéines qui vont permettre l'amplification de l'expression des gènes. Par conséquent, la transcription à un même promoteur peut être régulée par la fixation de multiples facteurs de transcription à des éléments régulateurs. C'est ce qui

permet un contrôle complexe de l'expression des gènes (Sandelin et al., 2007). Par contre, le recrutement de facteurs de transcription au niveau des séquences régulatrices des gènes n'est pas suffisant pour qu'il y ait transcription. L'intervention des facteurs généraux de la transcription est nécessaire.

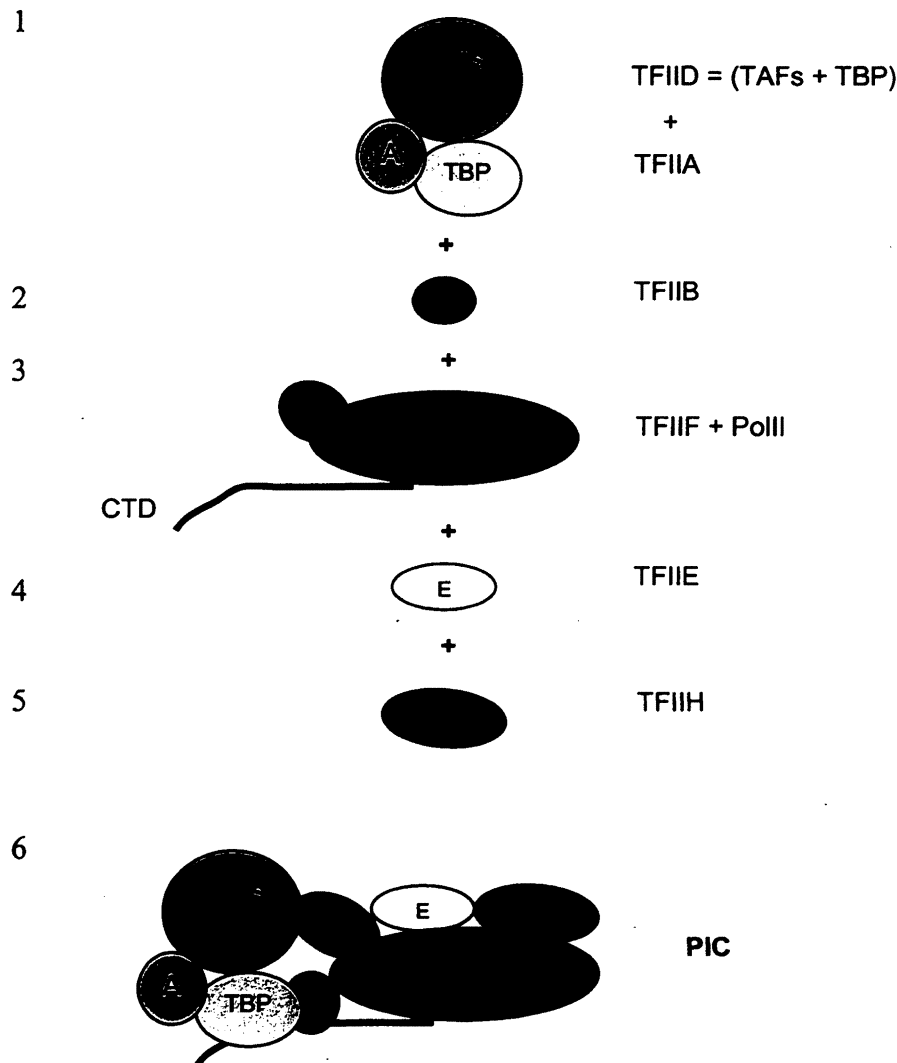


**Figure 5 Organisation des régions régulatrices d'un gène**

Schéma adapté de (Levine and Tjian, 2003) montrant les régions régulatrices d'un gène et leurs composants. Arrangement complexe d'activateur en groupe contenant plusieurs modules intercalés avec des éléments « *silencer* » et « *insulator* » qui peuvent être situés 10-50 kb en amont ou en aval d'un promoteur minimal contenant une boîte TATA (TATA), les séquences initiateurs (INR) et des éléments de promoteur en aval (DPE).

La première étape à l'induction de la transcription est la formation du complexe de préinitiation (PIC), au niveau du promoteur minimal, qui contient les facteurs généraux de la transcription de la famille TFII (facteur de transcription nécessaire à la l'ARN polymérase II), TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIIE, TFIIF et TFIIH. Ce complexe permet de positionner l'ARN polymérase II (ARN polII), un complexe formé de 12 sous-unités (Rpb1-Rpb12), au niveau des sites de début de la transcription situés au promoteur. De plus, un complexe multiprotéique CoA, le médiateur, participe à l'assemblage du PIC. Celui-ci forme un pont moléculaire entre l'ARN polII et les domaines d'activation de certaines protéines (Hatzis and Talianidis, 2002; Kim and Lis, 2005). Étant donné que la chromatine est une structure flexible, le médiateur peut lier des éléments proches du promoteur et des éléments régulateurs distants en formant une boucle qui permet le rapprochement de ces régions (Hatzis and Talianidis, 2002). L'assemblage séquentiel du

PIC, contenant l'ARN polII et les facteurs généraux de la transcription, est aujourd'hui bien documenté (Figure 6) (Hori and Carey, 1994; Roeder, 1996; Spencer and Groudine, 1990). La protéine TBP, une sous-unité de TFIID, est la première à se lier au niveau du promoteur minimal et est suivi par TFIIB. Ensuite, un complexe préformé de TFIIF et de la Pol II se fixe, permettant le positionnement de la Pol II au site de début de la transcription (TSS). Sa liaison est suivie de TFIIIE puis, finalement, TFIIFH complète l'assemblage du complexe de préinitiation.



**Figure 6 Formation du complexe de préinitiation**

TBP se lie en premier au promoteur, puis vient se joindre TFIIB, TFIID et TFIIA. Avant d'entrer dans PIC, l'ARN pol II et TFIIF sont liés entre eux et qui sont recrutés par TFIIB. Enfin, l'ARN pol II recrute TFIIIE, qui recrute ensuite TFIIFH pour compléter l'assemblage PIC (modifié de (Roeder, 1996)).

### **1.3 Rôles physiologiques des hormones stéroïdiennes**

La transcription des gènes eucaryotes fait intervenir une combinaison de facteurs activateurs et répresseurs qui se fixent à une région régulatrice de l'ADN. Parmi ces facteurs, on note les complexes de remodelage de la chromatine, les protéines à activité histone acétyltransférase, le médiateur et le complexe de préinitiation de la transcription. Cependant, le passage entre la répression d'un gène et son activation est un mécanisme finement régulé qui fait intervenir des facteurs de transcription pouvant être reconnus par divers ligands. Ces facteurs de transcription sont au cœur des processus physiologiques incluant la croissance cellulaire, le contrôle de l'apoptose, la différenciation cellulaire. Un dérèglement de la structure ou la fonction des facteurs de transcription conduit au cancer.

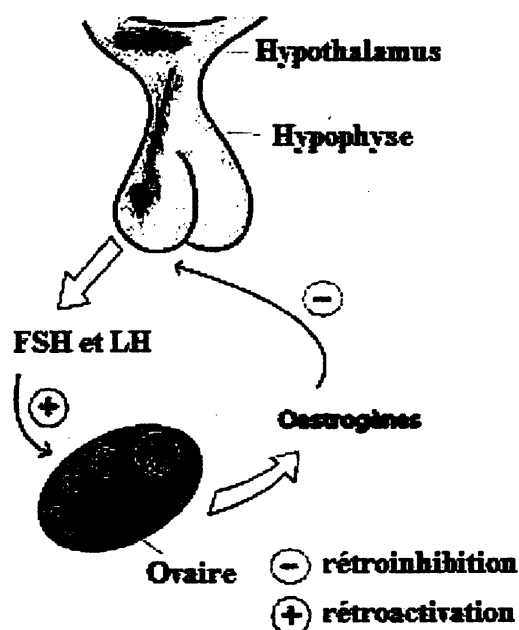
Les activités métaboliques des cellules sont affectées par les hormones, des messagers chimiques retrouvés dans la circulation sanguine. L'organisme produit une multitude hormones qui peuvent être regroupés en deux classes, les hormones dérivés d'acides aminées et les hormones stéroïdiennes. L'action des hormones est effectuée selon deux types de mécanisme. Le premier fait intervenir des molécules régulatrices, les protéines G, et un second messager intracellulaire. Ce mécanisme de signalisation caractérise les hormones dérivées d'acides aminés. Parmi les seconds messagers, l'AMP cyclique est le mieux connue. Le second mécanisme permet l'activation directe d'un gène par l'hormone. Ce mécanisme de signalisation est utilisé par les hormones stéroïdiennes. Ce second groupe d'hormones comprend les stéroïdes, des hormones liposolubles synthétisées à partir du cholestérol. Étant liposolubles, elles ont la capacité de diffuser à travers la membrane plasmique des cellules cibles. Celles-ci vont agir directement sur l'ADN afin de produire un ARN messager qui formera une protéine. Bien que les hormones aient des bienfaits pour les cellules, certaines sont aussi impliquées dans le développement de maladies (Anderson, 2002).

### 1.3.1 Les œstrogènes

Il est connu que les œstrogènes sont des hormones stéroïdiennes qui jouent un rôle fondamental dans la genèse et la progression du cancer du sein (Anderson, 2002). Des études cliniques révèlent qu'une exposition prolongée aux œstrogènes, telle que la puberté précoce, la nulliparité, l'absence d'allaitement, la ménopause tardive augmentent le risque de développement du cancer du sein (Nandi et al., 1995). Également, l'obésité accroît ce risque, et ce, surtout après la ménopause. En effet, le tissu adipeux possède une enzyme nommée l' $\alpha$ -aromatase qui convertit les androgènes en œstrogènes. Cette enzyme a pour effet d'accroître la production d'œstrogène dans l'environnement avoisinant le tissu adipeux. L'œstrogène agit sur ses cellules cibles en augmentant la prolifération cellulaire (Mallepell et al., 2006). Par conséquent, la division cellulaire accrue, ainsi que l'influence des facteurs environnementaux et de certains agents chimiques ou physiques, augmentent les risques de dommages au génome humain et conduit aux mutations. Lorsque les systèmes de réparation ne sont pas en mesure de réparer la cellule, celle-ci conserve ces mutations et devient anormale. C'est ce qui conduit au développement d'un cancer.

Les œstrogènes sont synthétisés principalement par les ovaires et, dans une moindre mesure, dans les testicules, le foie, la glande surrénale, les seins et le tissu adipeux. Les œstrogènes existent sous trois formes : l'œstrone (E1), l'œstradiol (E2) et l'œstriol (E3). La forme la plus active dans les tissus mammaires est l'E2 (Lee et al., 2006). Les œstrogènes sont principalement associés à la reproduction chez les femmes. Toutefois, leur importance sur le système reproducteur masculin ainsi que sur certains tissus non liés à la reproduction, dont le cœur, les os, le foie et le cerveau, a également été établie (Hall et al., 2001). Dans les tissus des mammifères, les œstrogènes exercent des effets biologiques essentiels à la manifestation d'un grand nombre de processus physiologiques tels que la croissance, la reproduction, le développement et le métabolisme cellulaire (Metivier et al., 2003).

La sécrétion de ces hormones est régulée par un système de rétrocontrôle hypothalamo-hypophysaire : l'hypothalamus sécrète la gonadolibérine (Gn-RH) qui active la libération des gonadotrophines hypophysaires (FSH et LH) (figure 8). Les hormones sécrétées dans la circulation sanguine vont être transportées jusqu'aux organes et aux cellules cibles. La réponse de ces cellules est dépendante de la présence de récepteurs spécifiques à l'œstrogène. Bien que ces hormones puissent atteindre la plupart des tissus, leurs effets auront lieu seulement sur les cellules cibles qui possèdent le récepteur spécifique auquel l'hormone peut se lier.



**Figure 7 Les rétroactions réglant la fonction ovarienne**

La rétroinhibition est effectuée par les œstrogènes sur le système hypothalamo-hypophysaire. Lorsque le niveau d'œstrogène diminue, l'hypothalamus sécrète la Gn-RH qui permet la sécrétion de la FSH et la LH. Modifié de Natisens.com.

### 1.3.1.1 Les récepteurs des œstrogènes

Dans les années 1960, une protéine pouvant lier spécifiquement l'œstradiol a été découverte dans l'utérus de la ratte (Jensen, 1962). Une vingtaine d'années se sont écoulées avant que la séquence de la protéine humaine soit établie par clonage (Green et



al., 1986). En 1990, une seconde protéine pouvant lier l'œstradiol a été découverte dans une librairie d'ADN complémentaire (ADNc) de prostate de rat et de testicules humains (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996). La protéine initiale a alors été nommée récepteur aux œstrogènes  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) et la seconde récepteur aux œstrogènes  $\beta$  (ER $\beta$ ).

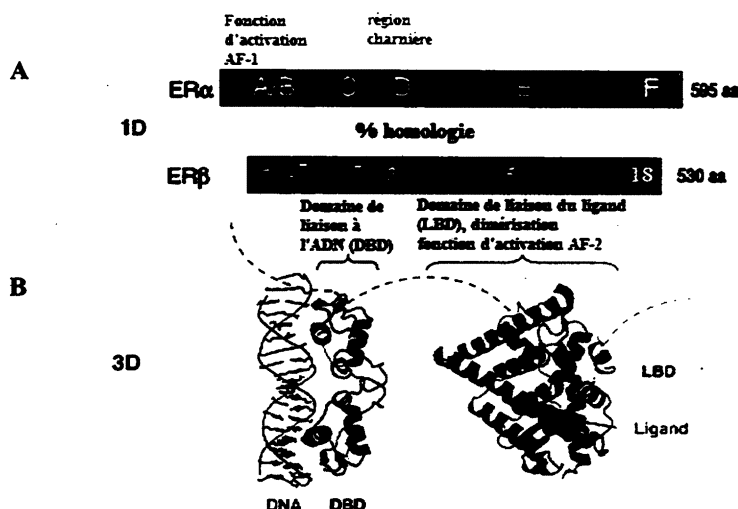
#### **1.3.1.1.1 La structure des récepteurs de l'œstrogène**

Les ERs font partie de la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdien/thyroïdien (Klinge, 2001; Metivier et al., 2003; Nye et al., 2002). Les isoformes des ERs sont des facteurs de transcription ligand dépendant et possèdent les domaines classiques (A/B, C, D, E et F) des récepteurs nucléaires (figure 9). La région aminoterminal (NH<sub>2</sub>), qui contient les domaines A/B, possède une séquence unique à chaque type de récepteur qui contient la fonction hormono-indépendante d'activation de la transcription 1 (AF-1). L'activité de cette région est possible grâce aux nombreux sites de phosphorylation qu'elle possède. En effet, les ERs sont des phosphoprotéines (Shao and Lazar, 1999). La serine 118 (S118) est le site majeur de phosphorylation par les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) démontré autant *in vitro* qu'*in vivo* en absence du ligand (Kato et al., 1995). Il est aussi connu qu'une mutation de cette sérine diminue la transactivation du ER $\alpha$  (Ali et al., 1993). Bien que cette région permette l'activité du récepteur, l'activation complète nécessite la fonction hormono-dépendante de transcription 2 (AF2). Cette fonction est retrouvée au niveau du domaine E qui contient également le site de liaison du ligand (LBD). Le domaine central de liaison à l'ADN (DBD), ou domaine C, joue un rôle crucial dans la dimérisation du récepteur et la liaison des ERs à l'ADN. Ce dernier est subdivisé en deux sous-domaines composés d'une région en doigt de zinc. Le premier doigt de zinc contient trois acides aminés spécifiques nommés « boîte proximale ou boîte P ». Ceux-ci permettent la reconnaissance du ER à la séquence palindromique 5'-AGGTCA(N)<sub>3</sub>TGACCT-3' (Klein-Hitpass et al., 1986) des éléments de réponse des ERs (ERE). Le second doigt de zinc contient les résidus nommés « boîte de dimérisation ou

boîte D » qui sont impliqués dans la dimérisation du récepteur. Le domaine D est le moins conservé, tant en longueur qu'en séquence, et sert de région charnière entre les domaines C et E/F. À la suite de la fixation du ligand, ce domaine va permettre le changement de conformation et le maintien de la structure tridimensionnelle de la protéine. Également, cette région est impliquée dans la localisation nucléaire des ERs grâce à une région de localisation du signal nucléaire (NLS). Ce domaine contribue à la spécificité et la polarité de la fixation du récepteur à l'ADN. De plus, des études ont montré que la région NLS pourrait établir le contact avec des corépresseurs (Corpet et al.) en l'absence de ligand et maintenir la transcription inactive (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995). La région carboxy-terminale (COOH) de cette protéine, ou domaine F, absente de certains récepteurs nucléaires et sa fonction demeure peu connue.

Certains domaines fonctionnels des ER $\alpha$  et ER $\beta$ , représentés à la Figure 9, montrent un très haut niveau d'homologie, particulièrement le DBD et le LBD qui montrent une homologie respective de 97 et 59 % (Edwards, 2005). En revanche, une grande divergence est observable à l'extrémité amino-terminale et carboxy-terminale où l'homologie respective est d'environ 17 % et 18 % (Edwards, 2005). Il a été suggéré que les deux récepteurs pourraient avoir un rôle redondant dans la voie de signalisation de l'œstrogène. Par contre, des études de localisation dans les tissus montrent un patron d'expression différentiel des récepteurs aussi bien chez la souris que chez l'homme (Mosselman et al., 1996). Par exemple, ER $\alpha$  est exprimé notamment dans les seins, l'utérus, le cerveau, alors que ER $\beta$  montre un patron d'expression plus restreint dans les ovaires, la prostate, les testicules, la rate, le poumon, l'hypothalamus et le thymus (Couse, 1997).

L'existence d'un récepteur membranaire aux œstrogènes, GRP30, a été proposée par deux équipes de recherche (Filardo et al., 2000; Revankar et al., 2005). Par contre, son classement parmi les récepteurs des œstrogènes demeure toujours un sujet de controverse (Levin, 2009).



**Figure 8 Les isoformes du récepteur de l'œstrogène et son organisation structurale**

A : La structure 1D montre les différents domaines des récepteurs nucléaires : en rouge, le domaine N-terminal ou A/B; en bleu, le domaine de liaison à l'ADN (DBD) ou C; en rose, la région charnière ou D; en vert, le domaine de liaison du ligand (LBD) ou E; en jaune, la région C-terminale ou F. Les domaines C et E sont très conservés entre les deux isoformes, montrant une homologie respective de 97 % et 59 %. Les régions A/B, D et F sont peu conservées et ont une homologie de 17,5 %, 30 % et 18 % respectivement. B : La structure 3D permet de visualiser le repliement du récepteur en présence du ligand. Le ligand est situé au niveau du LBD et est représenté en rouge écarlate. Image modifié de Wikipédia et (Edwards, 2005)

### 1.3.1.1.2 Régulation dépendant des récepteurs aux œstrogènes

La diffusion de l'œstrogène au travers de la membrane plasmique influence l'expression des gènes par divers mécanismes, soit par la voie génomique et la voie non génomique représentés à la Figure 10. Dans la voie génomique, le récepteur de l'œstrogène se dimérise à la suite de la liaison du ligand et se lie aux régions ERE situées au niveau des promoteurs des gènes cibles (Welboren et al., 2009). Cependant, il a été démontré à la suite des analyses dans tout le génome que plusieurs gènes régulés par le récepteur de l'œstrogène ne possèdent pas de sites ERE (O'Lone et al., 2004). Également, il est connu que des phosphorylation peuvent avoir lieu sur le récepteur et ainsi permettre son activation en absence du ligand (Cui et al., 2004). Le second mécanisme est dit non-génomique puisqu'il agit par l'intermédiaire de récepteurs membranaires qui entraînent

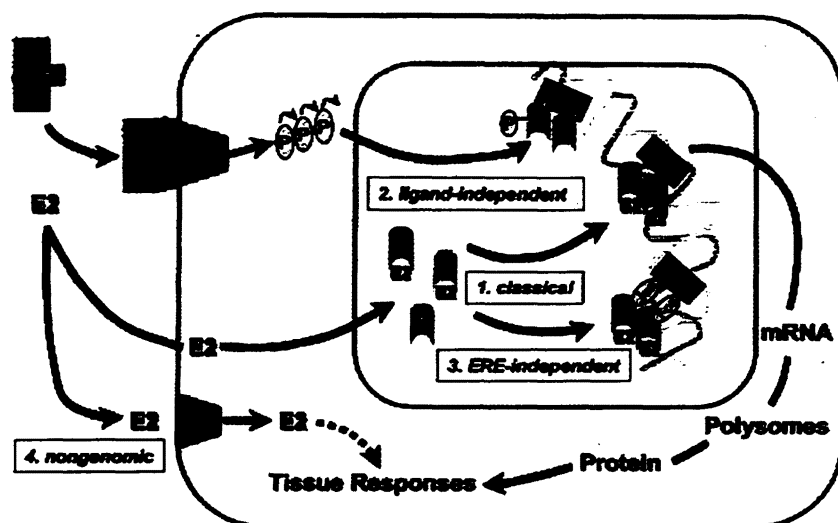
une cascade de réactions telles que des phosphorylations et qui modulent des fonctions physiologiques rapides (Chimento et al., 2010; Revankar et al., 2005).

#### **1.3.1.1.3 Les voies de signalisation génomique**

##### **1.3.1.1.4 La voie classique**

La voie génomique dite classique est la voie de signalisation qui est dépendante du ligand- et de l'ERE-. Afin de réguler la transcription, un changement de conformation du récepteur a lieu à la suite de la liaison du ligand. Ce changement de conformation permet non seulement la liaison aux régions ERE, mais est essentiel au recrutement des corégulateurs positifs ou négatifs de la transcription, nommés respectivement CoAs (Aranda and Pascual, 2001) et CoRs (Burke and Baniahmad, 2000; Corpet et al., 2000). En absence de ligand, ER $\alpha$  est associé à un complexe multiprotéique composé de plusieurs protéines, dont les protéines du choc thermique hsp90 (Inano et al., 1994) et hsp70 (Landel et al., 1995). Également, il a été montré qu'en absence de ligand, le récepteur peut se lier aux régions ERE avec des corépresseurs de la transcription, tels que NCOR1 (Metivier et al., 2008; Metivier et al., 2003; Xu et al., 1999).

Lorsque l'œstrogène se lie à la région LBD, il y a un changement de la conformation du récepteur qui permet un détachement des corépresseurs, la dimérisation du récepteur et la création de nouveaux sites d'interaction pour les CoAs (Leo and Chen, 2000). Le dimère ER peut ensuite lier les gènes cibles au niveau de ces séquences spécifiques, soit l'ERE. Il s'ensuit du recrutement des corégulateurs et de la machinerie transcriptionnelle afin d'effectuer la transcription du gène cible.



**Figure 9 Les différentes voies de signalisation cellulaire par les récepteurs de l'œstrogène.**  
Les deux mécanismes différents, soient la voie génomique, classique (1), indépendante de l'ERE via les cascades de phosphorylation (2), indépendante de l'ERE via AP1 (3), et la voie non-génomique (4) (Hall et al., 2001).

L'activation de la transcription par les ERs nécessite la présence de complexes protéiques CoAs. Onate *et al.* sont les premiers à avoir cloné un CoA pour les récepteurs stéroïdiens (Onate et al., 1995). Ils ont démontré que ER interagit avec SRC-1 afin d'induire la transcription des gènes cibles. D'autres équipes ont démontré que le complexe CBP/p300 peut interagir avec SHR-1 et les facteurs généraux de la transcription (Chakravarti et al., 1996; Hanstein et al., 1996). Plusieurs autres CoAs tels que RIP140 et GRIP1 ont été trouvés (Glass et al., 1997; Halachmi et al., 1994). Montano *et al.* ont identifié un répresseur de l'expression des gènes par ER (Montano et al., 1999). La découverte et l'identification de CoAs et corépresseurs de la transcription par ER démontrent sa complexité d'action.

La technique de l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) a permis d'évaluer la durée d'un cycle transcriptionnel. Il a été montré que l'association des complexes régulateurs avec la chromatine est cyclique et se produit entre 30 et 60 minutes à plusieurs promoteurs (Liu and Bagchi, 2004; Metivier et al., 2003; Reid et al., 2003; Shang et al., 2000). Métivier et ses collaborateurs (Metivier et al., 2003) ont montré le

relâchement et le recrutement dans le temps de différents complexes corégulateurs à une même région de la chromatine, soit le promoteur du gène *TFF1*. À la suite de leurs expériences, ils ont démontré l'existence de trois types de cycle distinct, soit un cycle initial non productif permettant la préparation du promoteur en vue de la transcription et deux autres cycles assez lents permettant la transcription.

#### **1.3.1.1.5 La voie indépendante de l'ERE**

L'effet génomique de l'œstrogène peut se faire sans l'intervention des séquences ERE. Dans un tel cas, des facteurs de transcription dont NF- $\kappa$ B, l'« *activator protein 1* » (AP-1) ou la protéine régulatrice SP1 sont nécessaires. Dans un premier temps, il y a formation d'un complexe qui contient ER et les facteurs de transcription. Ensuite, ce complexe va interagir avec le complexe fos-jun au niveau des sites AP-1 ou au niveau des régions promotrices GC riches via la protéine SP1.

#### **1.3.1.1.6 La voie indépendante du ligand**

L'activation des ERs peut se faire, en absence du ligand, par la voie des facteurs de croissance tels que l'« *insulin-like growth factor* » (IGF)-1, le « *transforming growth factor* » (TGF-B), l'« *epidermal growth factor* » (EGF) ou la voie de signalisation Wnt/b-catenin. Tous ces facteurs ont pour effet la phosphorylation de la région AF-1 du ER, soit par leurs actions directes ou en activant une cascade de phosphorylation impliquant les « *mitogen activated protein kinase* » (MAPK) et P13/AKT.

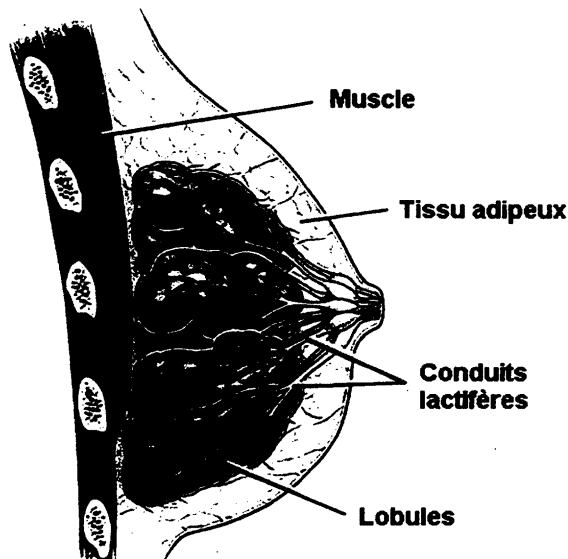
#### **1.3.1.1.7 La voie non-génomique**

La voie non génomique fait intervenir un type de ER localisé à la membrane, le récepteur des œstrogènes couplé à une protéine G, GPR30. Cette voie de signalisation fait intervenir des seconds messagers comme  $\text{Ca}^{2+}$  et AMPc afin d'activer des voies de transduction du signal comme la voie des protéines kinases C (PKC)/MAPK (Hall et al., 2001).

### **1.3.2 Les cancers hormonaux dépendants associés**

Les cancers hormonaux dépendants se développent dans les tissus sensibles aux hormones sexuelles, tels que le sein, l'endomètre, l'ovaire, la prostate. Ils sont stimulés par ces hormones. Un million de cancers du sein sont découverts chaque année dans le monde et 400 000 femmes en meurent. Le cancer du sein est le type de cancer le plus diagnostiqué chez la femme. Au Canada, il représente 28 % des cas de cancer chez les femmes (Statistique Canada). Au Québec, le nombre de femmes qui recevra un diagnostic de cancer du sein en cours d'année est estimé à 6 100 (Fondation du cancer du sein). C'est un grave problème de santé publique puisqu'il touche 1 femme sur 9.

Le cancer du sein est une croissance maligne multifactorielle qui débute dans les conduits lactifères et les lobules (Figure 7). Ce cancer peut se développer chez l'homme et la femme mais, avec une incidence moindre chez l'homme, soit moins de 1 % des cas de cancer du sein.



**Figure 10 Structure de la glande mammaire.**

Figure adaptée de <https://my.advocatehealth.com>, coupe sagittale d'un sein.

Les cellules cancéreuses émergent à la suite d'une combinaison d'anomalies épigénétiques et génétiques qui causent un dérèglement de l'expression génique. Certaines cellules cancéreuses peuvent se multiplier en absence de certains facteurs de croissance requis pour la prolifération cellulaire. Près de 70 % des cancers du sein sont dépendants de l'œstrogène pour la prolifération cellulaire puisqu'ils possèdent des ER $\alpha$  (Normanno et al., 2005) d'où l'importance d'étudier les mécanismes de régulation par les récepteurs aux œstrogènes.

## 1.4 Hypothèse et objectifs

Les récepteurs nucléaires nécessitent la coopération de nombreux CoAs et corépresseurs afin d'avoir leurs effets sur les cellules cibles. L'interaction de la protéine KDM5a avec ER $\alpha$  a été montrée à l'aide de protéine de fusion GST (Chan and Hong, 2001). De plus, lors d'essais de bioluminescence à l'aide du gène marqueur de la luciférase, l'augmentation de la transcription par ER $\alpha$  en présence de KDM5a a été montrée (Chan



and Hong, 2001). Par contre, la protéine KDM5a est connue pour son activité déméthylase spécifique à H3K4me2/me3 (Klose et al., 2007; Lopez-Bigas et al., 2008; Pasini et al., 2008; Secombe and Eisenman, 2007; Tu et al., 2008). Ces marques de méthylation sont associées aux promoteurs et aux régions régulatrices des gènes actifs. Par ailleurs, le rôle de corépresseur de la transcription effectué par la protéine KDM5a est connu (Christensen et al., 2007; Pasini et al., 2008). Par contre, le rôle de la méthylation et de la déméthylation de H3K4 et des protéines responsables est peu connu pour la fonction des récepteurs stéroïdiens. Le but des travaux présentés dans ce manuscrit a été d'étudier ces liens entre le ER $\alpha$  et KDM5a au niveau des gènes régulés par ER $\alpha$  et principalement du gène de référence *TFF1*.

Notre hypothèse stipule que la protéine KDM5a possède un rôle de Coactivateur dans un modèle impliquant le récepteur de l'œstrogène  $\alpha$ . Sa présence serait essentielle pour l'activation des gènes cibles du ER $\alpha$ .

L'objectif général du projet est de caractériser le mécanisme d'action de KDM5a ainsi que la méthylation et la déméthylation de H3K4 pour l'activation des gènes régulés par ER $\alpha$ .

Afin de vérifier notre hypothèse, le rôle de la protéine a été étudié par l'utilisation d'ARN interférents de KDM5a dans les cellules MCF-7, cellules couramment utilisées comme modèle de cancer de la glande mammaire. Les effets de la perte de la protéine KDM5a sur l'expression des gènes ont été vérifiés par RT-qPCR et par microarray. Également, les effets sur les acteurs nécessaires à l'expression des gènes tels l'ARN polIII ou les marques de méthylation ont été visualisées par immunoprécipitation de type western et la localisation par CHIP. De plus, une analyse de localisation dans tout le génome a été effectuée à l'aide d'une analyse par ChIPseq.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1 ARN interférants, vecteurs d'expression et transfection

Afin de déterminer l'implication de KDM5a dans l'expression des gènes cibles de ER $\alpha$ , une diminution de son expression est effectuée en utilisant un vecteur d'expression lentiviral (pLVTHM) qui code pour des petits ARN interférant obtenus à partir de molécules en épingle à cheveux (*shRNA*) qui ciblent l'ARNm de KDM5a. Les vecteurs pLVTHM-shKDM5a ont été construits à partir du vecteur pSUPER-KDM5a obtenu dans notre laboratoire. La séquence codant pour l'ARN interférant (Tableau 1) a été excisée du vecteur pSuper-KDM5a en digérant les sites EcoRI/ClaI. Les fragments d'ADN ont été déposés sur gel d'agarose 1% pour une purification à l'aide de la trousse commerciale *Qiaquick* (QIAGEN sciences, Maryland, É.-U, cat 28106). L'insertion a été faite entre les sites Mlu/ClaI du vecteur pLVTHM.

**Tableau 1 Séquence des ARN interférants utilisés pour la déplétion de KDM5a**

*Nom de la Séquences d'ARN interférant  
construction*

shCTRL	Aucune (pLVTHM vide)
shKDM5a1	GAACCTGAGGCAATGACCTTCAAGAGAGGTCATTGCCTCAAGTTC
shKDM5a2	GTGTTACAGAAGCATTGTTTCAAGAGAACAATGCTTCTGTAACAC

La ligation a été effectuée avec 25ng de vecteur vide combiné à 200ng d'insert. Ensuite, 1  $\mu$ l de ligase (NEB, Ontario, Canada, cat M2203) et 2  $\mu$ l de tampon de ligase ont été ajoutés. Le volume a été complété à 20  $\mu$ l avec de l'eau stérile. Une incubation à 16°C a

été effectuée avec 10 µl du mélange. Le produit de ligation a été transformé par thermoinduction dans la souche *E.coli* STBL3. Le produit de ligation a été incubé 20 minutes sur glace puis un choc thermique à 42°C pour 30 secondes, a été fait. Une incubation de 1 heure à 37°C avec agitation a été effectuée suite à l'ajout de 500µl de milieu *Lysogeny broth* (LB). Le milieu a été étendu sur une gélose LB contenant µg/ml d'ampicilline et incubé pour une nuit à 37°C. Le lendemain, une colonie a été prélevée et ensemencée dans 2 ml de milieu LB. Afin de déterminer la présence de l'insert, l'ADN plasmidique a été purifié à l'aide de la trousse commerciale *QIAGEN plasmid mini* (QIAGEN, cat.28704) et une vérification par digestion enzymatique suivie d'une visualisation sur gel d'agarose a été effectuée. Les bactéries contenant des clones positifs ont été incubées dans 200 ml de milieu LB pour faire une purification à l'aide de la trousse commerciale *QIAGEN plasmid maxi* (QIAGEN, cat.74106).

La journée de la transfection, le milieu de culture des cellules 293T est changé pour du milieu *Dulbecco's Modification Eagle's Medium* (DMEM) sans rouge phénol (Wisent inc., Québec, Canada, cat 219-051). Le milieu est supplémenté avec 5% de FBS, préalablement traité au charbon activé afin de retirer les œstrogènes. Les lentivirus sont produits dans les cellules 293T grâce à une co-transfection (*PEI*) du vecteur lentiviral (pLVTHM vide ou pLVTHM/shKDM5a) et des plasmides codant pour des protéines nécessaires à l'emballage des virus (PAX2 et MD2G). Le surnageant de culture contenant les virus est récolté 48 h après puis est passé sur un filtre 0,45µm et ajouté aux cellules MCF-7 en présence de 10µg/ml de polybrène. Les cellules MCF-7 sont incubées avec les virus pour une période de 24 h. Ensuite, les cellules sont incubées dans du milieu sans œstrogènes pour 48 heures et sont traitées ou non avec 100 nM d'E2 ( $17\beta$ -œstradiol, Sigma). Le temps de stimulation diffère selon l'expérience réalisée.

## 2.2 Culture cellulaire

Les cellules MCF-7 (*Michigan Cancer Foundation-7*), une lignée cellulaire mammaire cancéreuse exprimant principalement ER $\alpha$  et couramment utilisées comme modèle cellulaire pour l'étude des mécanismes d'action des œstrogènes, sera utilisé dans ce projet. Les cellules sont maintenues dans un milieu DMEM (Wisent) auquel est ajouté 10% de sérum fœtal bovin (FBS) (Wisent). Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37 °C ajusté à 5% CO<sub>2</sub>. 72 heures avant chaque expérience, une privation en œstrogènes est réalisé grâce à une incubation dans du milieu DMEM sans rouge phénol (Wisent), supplémenté avec 5% de FBS, préalablement traité au charbon activé afin de retirer les œstrogènes.

### **2.3 Extraction d'ARN et RT-qPCR**

L'extraction de l'ARN totale des cellules MCF-7 est effectuée à l'aide de la trousse commerciale *RNeasy* (Qiagen, cat 74106). La transcriptase inverse est effectuée à l'aide de la trousse commerciale *QuantiTect rev.* (Qiagen, cat. 205310). L'analyse de l'expression différentielle des gènes est effectuée par PCR quantitatif (Biorad) en duplicat en utilisant le Sybr green. Toutes les données ont été normalisées selon l'abondance du gène *GAPDH*. Les amorces qui ont été utilisées sont présentées dans le tableau 2.

### **2.4 Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)**

L'immunoprécipitation de la chromatine a été fait comme décrit précédemment (Gevry et al., 2007). Les cellules ont été rincées avec du PBS (Bioshop Canada inc., Burlington, ON, CA) puis un pontage a été effectué à l'aide d'une solution 1,1% PBS-formaldéhyde (Bioshop Canada inc., Burlington, ON, CA). Après l'arrêt de la réaction avec 1ml d'une solution 2,5 M glycine (GLN002.5, Bioshop Canada inc., Burlington, ON, CA), les cellules ont été rincées avec du PBS froid puis elles ont été récupérées par grattage. Elles ont été plongées dans l'azote liquide après avoir retiré tout le PBS. Elles ont été conservé à -80°C.

Les cellules ont été gardées sur glace 5 minutes à leur sortie du congélateur. Les cellules ont été resuspendues dans le tampon 1 (0,25 % Triton, 10mM EDTA, 0,5 mM EGTA et 10mM Hepes pH 6,5). Une incubation de dix minutes sur glace a été effectuée puis elles ont été centrifugées six minutes à 3500rpm. Le culot a été resuspendu dans le tampon 2 (200mM NaCl, 1mM EDTA 0,5 mM EGTA et 10mM Hepes pH 6,5). Les mêmes étapes qu'effectuées avec le tampon 1 ont été faites. Les cellules ont ensuite été lysées dans un tampon SDS (1%SDS, 10 mM EDTA, 50 mM Tris pH 8,1). Pour chaque plaque de 150 mm de cellules, 200 µl de tampon ont été ajoutés. Le lysat a été incubé sur glace 20 minutes puis il a été soniqué 7 fois. Après chaque sonication, le lysat a été incubé sur glace 3 minutes. Le lysat a été centrifugé à 4°C pour 10 minutes à 13000 rpm. Un aliquot correspondant à 5 % du volume du lysat a été conservé afin d'effectuer la courbe standard des analyses subséquentes de qPCR. Le lysat a été dilué 1/10 dans du tampon IP (0,01 % SDS, 1,1 % Triton 1,2 mM EDTA, 16,7 mM Tris pH 8,1 et 167 mM NaCl). L'ajout de 40 µl/ml de billes d'agarose A (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, É-U, cat 20333) préincubées avec du sperme de saumon 10 µg/ml et BSA 1mg/ml a été effectué pour une durée de 4 heures à 4°C avec agitation. Les billes ont été retirées et les anticorps ont été ajoutés pour la nuit à 4°C avec agitation (tableau 3). Les quantités d'anticorps utilisés sont de 2 µg, sauf pour l'anticorps KDM5a où 6 µl ont été utilisés. Le lendemain, 40 µl/ml de billes d'agarose A préincubées ont été ajoutées pour 4 heures à 4 °C avec agitation. Ensuite, les billes ont été lavées 1 fois avec chacun des tampons suivants : TSE-150 (0,1 % SDS, 1 % Triton, 2mM EDTA, 20mM Tris pH 8,1 et 150 mM NaCl), TSE-500 (0,1 % SDS, 1 % Triton, 2mM EDTA, 20mM Tris pH 8,1 et 500 mM NaCl) et LiCl (0,25 M LiCl, 1% NP40, 1% DOC, 1mM EDTA, 10mM Tris pH 8,1) puis 3 fois avec du TE (0,1M Tris, 1mM EDTA). Les complexes de protéine-ADN retenus sur les billes ont été élués à l'aide d'une solution de 1 % SDS/0.1M NaHCO<sub>3</sub> pour 10 minutes à 50 °C avec agitation. Le surnageant a été récupéré puis la réversion des pontages a été effectuée à l'aide d'une incubation à 65 °C pendant au moins 6 h. Ensuite, 20 µg de Rnase A ont été ajoutés à chaque échantillon puis une incubation à 37 °C pour 1 h a été effectuée. L'ADN a été purifié à l'aide de la trousse commerciale *QIAquick PCR*

*purification kit* (QIAGEN, cat. 28106) selon la procédure du fabricant et a été analysé par qPCR. Les amorces qui ont été utilisées sont présentées dans le tableau 2.

**Tableau 2** Amorces utilisées pour les analyses d'expression, par RT-PCR, et de localisation par ChIP

<i>Nom</i>	<i>amorce sens</i>	<i>amorce anti-sens</i>
RT-BCL2	GGCCGTACAGTTCACAAAG	GCCCTGTGGATGACTGAGTA
RT-CCND1	CCACTTGAGCTTGTTACCA	GCTGTGCATCTACACCGACA
RT-EBAG9	CCATCACCCAGTTTCGGTTA	TCCACTTAATTTCCGTCCTCT G
RT-GAPDH	CTCTGCTCCTCCTGTTTCGAC	TGACTCCGACCTTCACCTTC
RT-GREB1	GAGGGCTGGAAACAAATGG	TGGAAATGGAGACAAGGCG
RT-IGFBP4	CCCACGAGGACCTCTACATC	ATCCAGAGCTGGGTGACACT
RT-KDM5a	TCTCCTGGAAGTATCTCTGGAC	GGTTTCTCTTCCATGCTGTCA
RT-KDM5b	AGTTAAGAAAATGCGACCCC	GAATAGGATGTGTCTGAGGG
RT- TFF1	GTGCAAATAAGGGCTGCTGT	GCAGATCCCTGCAGAAAGTGT
ChIP +1	GGCCTCTCATCCCTGACTC	GCGCAGATCACCTTGTTCTC
ChIP -6540	TGTAGGAACCTGCACACGAG	AGATGGAAGGGTGCCTCTTT
ChIP ERE1	CAAAGTGTTGGGATTACAGGC	CATGAAGCCCATTCCGTCTAG
ChIP ERE3	AGTGAGTGACCCTCCTGAGC	AACAGTGGCCAAGACACCTC
ChIP+2200	ACACCTGGGTCTCTGGAATG	CAAGCAGGTTGAACAAAGCA

## 2.5 Immunoprécipitation de la chromatine suivie du séquençage

L'immunoprécipitation de la chromatine suivi du séquençage a été effectué au laboratoire d'Elizaveta Benevolenskaya comme décrit précédemment (Lopez-Bigas et al., 2008). Le protocole détaillé est retrouvé à l'adresse suivante : <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=2101>.

## 2.6 Extraction des protéines

Suite à l'infection des cellules MCF-7 par les constructions shCTRL ou shKDM5a, les protéines cytoplasmiques et nucléaires ont été extraites. Les cellules sont d'abord centrifuger pour retirer le surnageant de culture puis elles sont laver avec du PBS 1X. Une solution de tampon de base est utilisé pour faire les solutions extraction cytoplasmiques et nucléaire (50mM tris pH8, 0,5mM EDTA pH8, 50mM NaCl, 1mM

DTT, 1X cocktail d'inhibiteur de protéases, 1X PMSF). Pour l'extraction des protéines cytoplasmiques, 1 ml de solution de base contenant 1% NP40 a été ajouté aux cellules. Après une incubation de 20 minutes sur glace, les cellules ont été centrifugées puis le surnageant qui contient les protéines cytoplasmiques a été récolté. Ensuite, 200ul de solution de base contenant 1% SDS a été ajouté au culot de cellules. Les cellules ont été placées à -80°C pour une période de 24 heures. Le culot a été soniqué 5-15 secondes afin de briser l'ADN génomique. Après centrifugation, le surnageant qui contient les protéines nucléaires, a été récupéré. Les protéines ont été dosées au spectrophotomètre à l'aide la technique du Bradford (Biorad) et conservé à -80°C.

## **2.7 Immunobuvardage de type western**

Afin de visualiser les quantités de protéines KDM5a et KDM5b dans les extraits nucléaires, 10 µg de protéines ont été déposées sur un gel de 7% polyacrylamide. Les échantillons ont été chauffés à 95°C avec le tampon pour échantillons 1X (6X : 187mM Tris pH 6,8, 6% SDS, 80% glycérol, 0,03% bleu de bromophénol, 0,05% β-mercaptoéthanol). La migration a été effectuée à 100V pour deux heures dans un tampon de migration (25mM Tris, 0,1% SDS, 192mM glycine). Le transfert a été effectué sur une membrane de PVDF (ROCHE, laval, Québec, Canada, cat. 03010040001) à l'aide d'un appareil de transfert semi sec (Biorad, 170-3940). Le transfert a été effectué pour 1 heure à 40 ma par gel dans un tampon de transfert (48mM tris, 39mM glycine, 1,3mM SDS, 20% méthanol). La membrane a été bloquée avec une solution de 10% lait dans du TBST 0,1% (50mM tris, 150mM NaCl, 0,1% tween, pH 7,5) pour la nuit. Les anticorps primaires ont été ajoutés dans une solution 1% lait dans du TBST 0,1%. La description des anticorps primaires et secondaires utilisés est retrouvée dans le tableau 3. Les concentrations qui ont été utilisées pour KDM5a et KDM5b sont de 1/2000 et pour l'actine la concentration est de 1/10000. La détection a été faite avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé avec la HRP (Horse radish peroxidase). La quantité utilisée est de 1/10000.

**Tableau 3 Liste des anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation de type Western et pour l'immunoprécipitation de la chromatine**

Anticorps	# de catalogue	Compagnie	ChIP	Western
ER $\alpha$	HC-20	Santa cruz, Laboratoire de Elizaveta	x	x
KDM5a 2269		Benevolenskaya Laboratoire de Elizaveta	x	
KDM5a 2270		Benevolenskaya		x
RNA pol II (8WG16)	MMS-126R	Cedarlane, Burlington, Ontario, CA	x	
H3K4me2	ab32356	Abcam, Cambridge, Massachusetts, É.-U..	x	
H3K4me3	39915	Active motif, Carlsbad, Californie, É-U	x	
H3	ab1791	Abcam, Cambridge, Massachusetts, É.-U..	x	
Actin beta	A2066	Sigma-Aldrich, St-Louis, É.-U.		x
ECL Anti-rabbit	Na934v			
IgG-HRP		GE Healthcare, Canada		x



## CHAPITRE 2

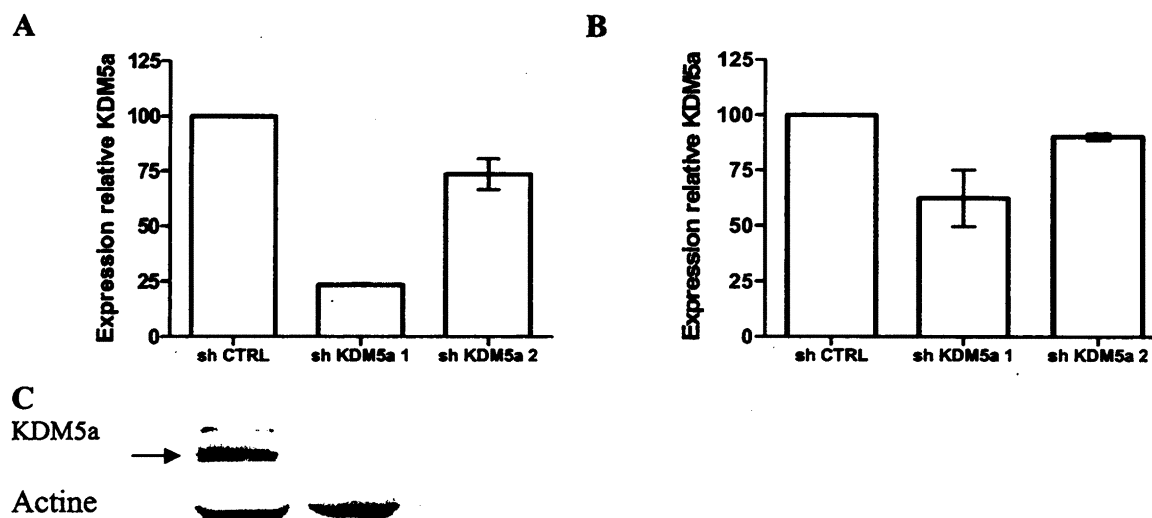
### RÉSULTATS

#### 2.1 L'identification d'un ARN interférant (sh ARN) efficace pour la déplétion de KDM5a

Afin de vérifier le rôle de KDM5a sur la transcription des gènes dépendants du ER $\alpha$ , nous avons effectué une déplétion de la protéine dans une lignée cellulaire ER $\alpha$  positive MCF-7. Cette déplétion a été effectuée à l'aide d'ARN interférant en épingle à cheveux (sh ARN) ciblant spécifiquement l'ARNm de KDM5a afin de diminuer l'expression du gène. Deux constructions différentes obtenues dans notre laboratoire étaient à notre disposition. L'efficacité à diminuer l'expression de KDM5a a été validée à différents jours post infection à l'aide d'analyse par qPCR et d'immunobuvardage de type western (Figure 11).

Les résultats montrent une réduction de l'expression de KDM5a dans les cellules infectées avec les shKDM5a comparativement aux cellules infectées avec le shCTRL. Cependant, l'efficacité des deux constructions utilisées diffère. En effet, les analyses par RT-qPCR montrent une baisse de l'expression de KDM5a est plus importante avec la construction 1, et ce, à trois jours post infection. En effet, une baisse de 75% est obtenue avec la construction 1, alors qu'elle est d'environ 40% avec la construction 2. De plus, à quatre jours post infection, la diminution de l'expression de KDM5a n'est plus aussi efficace puisqu'on observe une baisse de 40% avec la construction 1 et de 10% avec la construction 2. L'analyse par immunobuvardage de type western confirme une baisse de la protéine avec la construction 1, à trois jours post infection. Cette expérience nous a permis de démontrer que la construction 1 conduit à la baisse de la protéine KDM5a suite à la déplétion de son ARN messager. À la suite de ces résultats, nous avons effectué les

expériences subséquentes avec la construction 1 avec une période d'infection de trois jours.



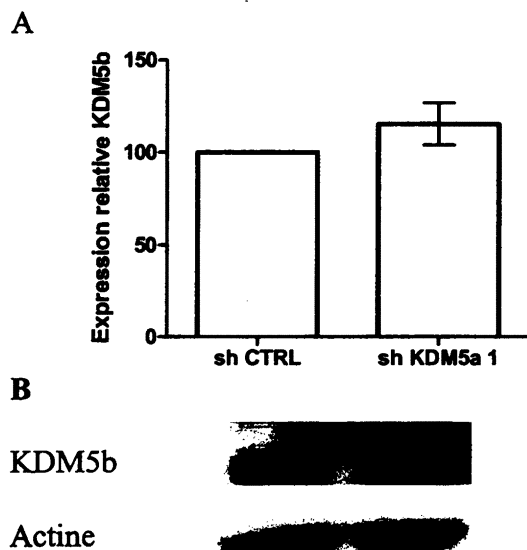
**Figure 11 La déplétion par ARN interférants de KDM5a dans les cellules MCF-7.**

Les cellules ont été transfectées avec des lentivirus exprimant deux shARN différents spécifiques pour KDM5a, shKDM5a1 et shKDM5a2. Pour le témoin, les cellules ont été transfectées avec le vecteur vide, shCTRL. L'expérience a été répétée à trois reprises A : L'ARN total a été extrait à trois jours post infection et analysé par qPCR. B : L'ARN total a été extrait à quatre jours post infection et analysé par qPCR. C : Les protéines nucléaires ont été analysées par immunobuvardage de type western. La protéine KDM5a apparaît à 196kDa et l'actine à 42 kDa L'actine a été utilisée comme témoin afin d'évaluer que la quantité de protéine déposée est uniforme pour chacun des extraits.

## 2.2 L'ARN interférant utilisé est spécifique à KDM5a

Afin de s'assurer que la déplétion de KDM5a par l'ARN interférant de la construction 1 n'affecte pas l'expression de la déméthylase KDM5b (PLU-1) appartenant à la même famille, nous avons effectué une analyse par qPCR et d'immunobuvardage de type western (figure 12). Les résultats obtenus montrent que la déplétion de la protéine KDM5a n'affecte pas l'expression de la déméthylase KDM5b. En effet, aucune différence n'est observable entre l'expression de KDM5b dans les cellules infectées avec la construction contrôle comparativement aux cellules infectées avec le shKDM5a 1. De plus, les résultats de l'immunobuvardage de type western confirme que la protéine

KDM5b n'est pas affectée par la construction shKDM5a 1. Par conséquent, la construction shKDM5a 1 n'affecte pas l'expression de la déméthylase KDM5b. Les effets observés sont dû à la perte de KDM5a seulement.



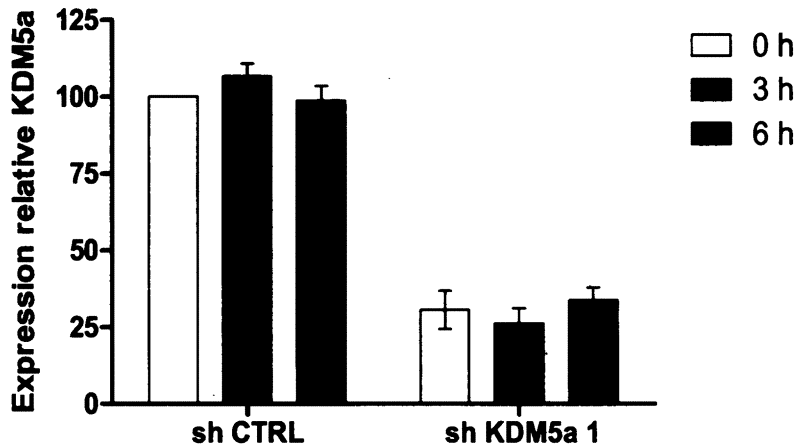
**Figure 12 La déplétion de KDM5a n'affecte pas l'expression des autres déméthylases de la famille JARID1a.**

Les cellules ont été transfectées avec des lentivirus codant pour le shKDM1. Le témoin négatif a été obtenu suite à la transfection des cellules avec le vecteur vide. L'expérience a été répétée à trois reprises. A : L'ARN total a été extrait à trois jours post infection et analysé par qPCR. B : Les protéines nucléaires ont été analysées par immunobuvardage de type western. L'actine a été utilisée comme témoin afin d'évaluer que la quantité de protéine déposée est uniforme pour chacun des extraits.

## 2.3 L'expression du gène *KDM5a* n'est pas affectée par l'œstrogène

L'expression de plusieurs gènes s'effectue sous le contrôle de facteurs de transcription tels que le récepteur de l'œstrogène. Afin de déterminer l'effet de l'œstrogène sur l'expression du gène *KDM5a*, les cellules ont été transfectées avec la construction shKDM5a 1 puis maintenues dans un milieu sans hormone pour une période de trois jours. Les cellules ont été traitées avec 10nM d'hormone (E2) pour une durée de zéro, de trois ou de six heures. Puis, les niveaux d'ARN messager ont été évalués par qPCR (Figure 13). Les résultats obtenus montrent que l'expression du gène *KDM5a* n'est pas affectée par l'hormone. En effet, les niveaux d'expression sont comparables autant dans

les cellules contrôles à zéro, à trois et à six heures que dans les cellules infectées avec la construction shKDM5a 1. Cette expérience nous a permis de montrer que l'expression de l'ARN messager de KDM5a n'est pas régulée par la quantité d'œstrogène présente dans le milieu de culture des cellules.



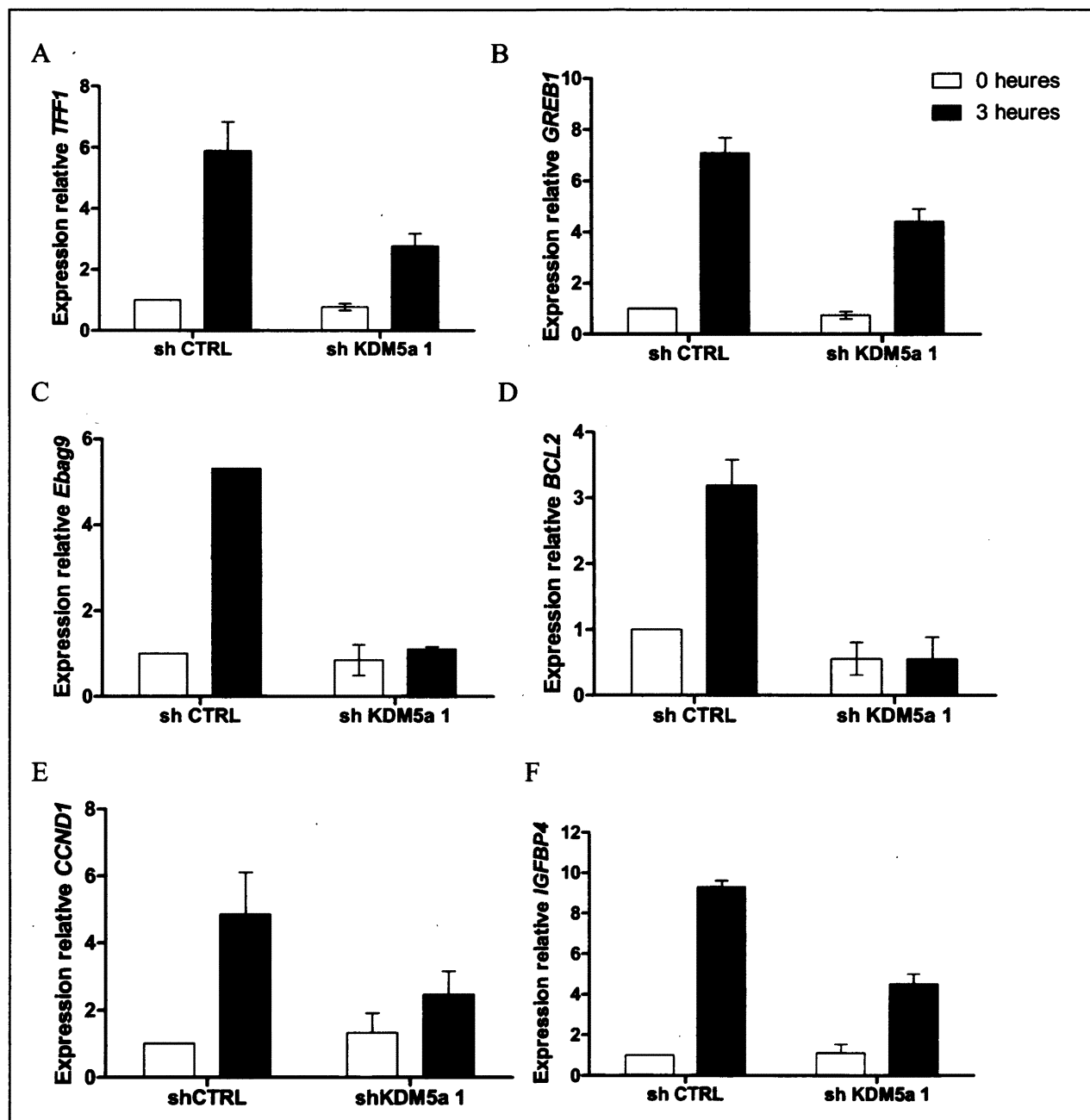
**Figure 13 L'expression de KDM5a n'est pas régulée par l'œstrogène.**

Les cellules ont été transfectées avec des lentivirus exprimant shARN de KDM5a, shKDM5a1. Le témoin utilisé est le vecteur vide, shCTRL. L'expérience a été répétée à trois reprises. Les cellules ont été traitées trois jours post-infection avec 100 nM de 17 b-estradiol pour zéro, trois ou six heures. L'ARN total a été extrait et analysé par RT-qPCR.

## 2.4 Le rôle de KDM5a pour la régulation des gènes dépendants du ERα

Après avoir déterminé les conditions optimales pour la déplétion de la protéine KDM5a, l'effet de sa diminution sur l'expression des gènes dépendants du ERα a été observé. Les cellules MCF-7 ont été transfectées avec la construction shKDM5a 1 dans un milieu sans hormone pour une période de trois jours. Ensuite les cellules ont été traitées avec E2 pour une période de zéro et de trois heures. L'ARN total a été extrait puis l'expression des gènes dépendants de l'œstrogène (*TFF1*, *GREB1*, *Ebag9*, *BCL2*, *CCND1*) a été évaluée par qPCR (Figure 14). Les résultats obtenus montrent que la protéine KDM5a semble avoir un rôle de Coactivateur pour ces gènes. En effet, l'expression de ces gènes est diminuée dans les cellules shKDM5a 1 comparativement aux cellules shCTRL. Puisque l'effet observé est le même pour tous les gènes dépendants du ERα, c'est-à-dire qu'il y a

une diminution de l'expression des gènes lorsqu'il y a une diminution de KDM5a, il semble que la protéine KDM5a a un effet coactivateur sur l'expression de ces gènes.



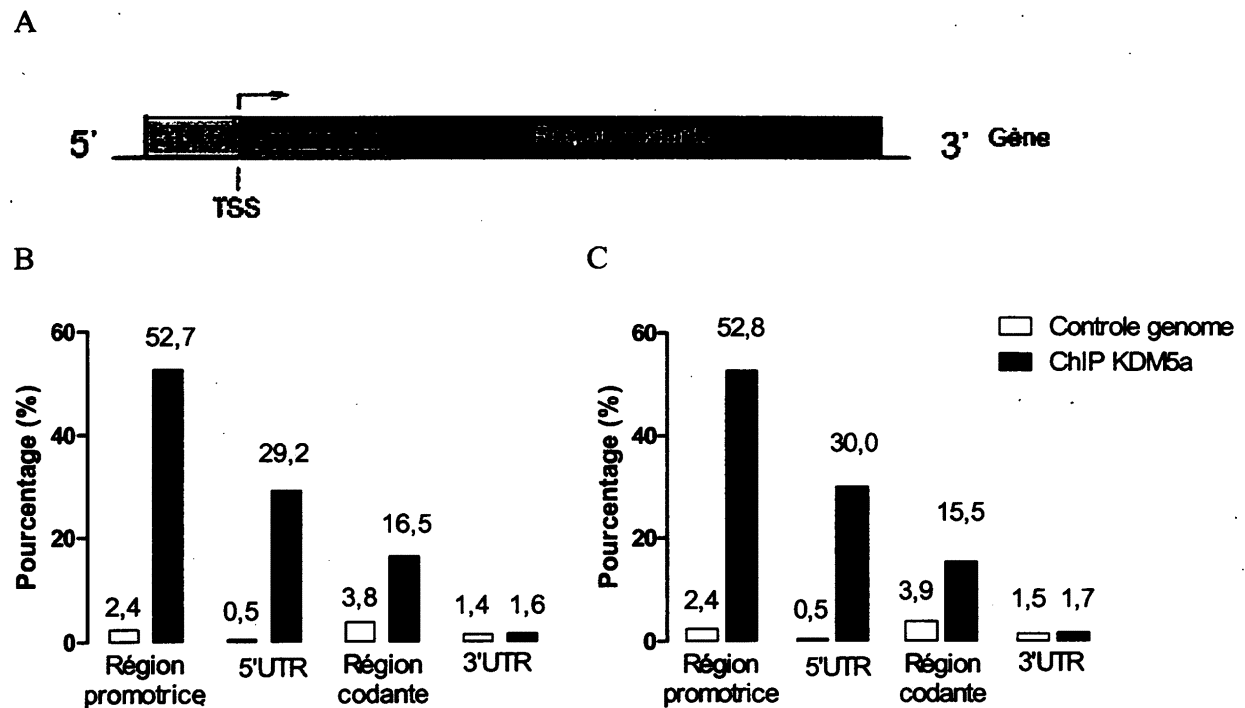
**Figure 14 La déplétion de KDM5a empêche l'activation des gènes dépendants du ERα.**

Les cellules ont été transfectées avec des lentivirus codant pour un shARN de KDM5a ou un sh contrôle. Les cellules ont été traitées avec 100 nM de 17 b-estradiol pour zéro ou trois heures. L'ARN total a été extrait trois jours post infection et analysé par RT-qPCR. L'expérience a été répétée à trois reprises. A. TFF1 B. *GREB1* C. *Ebag9* D. *BCL2* E. *CCND1* F. *IGFBP4*

## 2.5 La localisation dans le génome de la protéine KDM5a

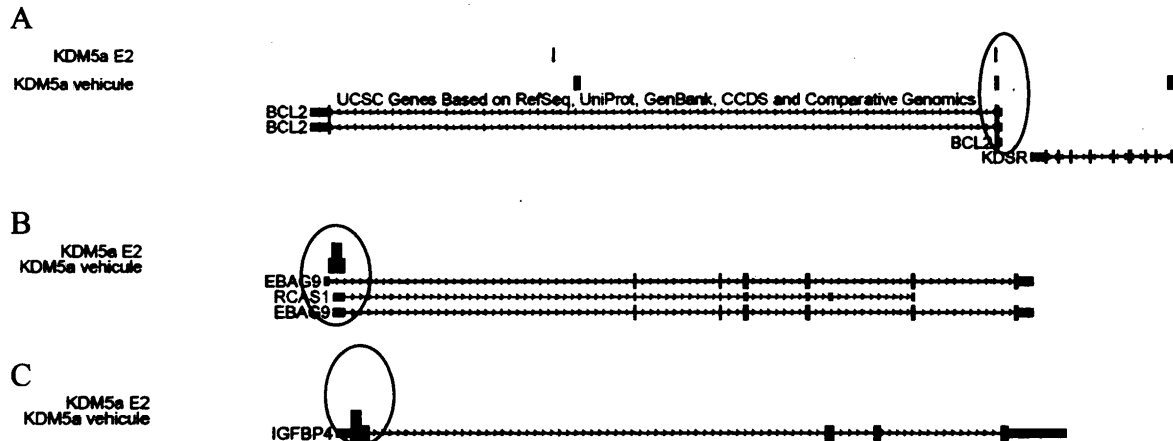
Les sites de liaisons à l'ADN peuvent être déterminés par immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Le ChIP produit une librairie de fragment d'ADN qui sont liés par la protéine d'intérêt *in vivo* soit de manière directe ou indirectement via une autre protéine. Par une méthode de séquençage à haut débit, il est possible d'identifier les fragments d'ADN appartenant à la librairie en les comparant avec une base de données du génome à l'étude. Afin de déterminer si le mécanisme d'action de la protéine KDM5a est lié à sa localisation au niveau des gènes dépendants du ER $\alpha$ , une analyse par immunoprécipitation de la chromatine suivie du séquençage (ChIP seq) a été effectuée dans le génome entier (Figure 15). Avec l'outil bioinformatique MACS (pour Model-based Analysis of ChIP-Seq) (Zhang et al., 2008), il a été possible d'identifier les régions des gènes où se localise la protéine KDM5a. MACS modélise localement le signal en l'approximant via une loi de Poisson, puis calcule la probabilité d'avoir par chance un nombre de lecture supérieur à celui induit par le modèle. La région promotrice a été établie du TSS jusqu'à 3000bp en aval. La région codante correspond à la partie du gène qui est traduite et fait opposition à la région 3'UTR qui n'est pas traduite. La région 5'UTR correspond à la région 5'UTR de l'ARN messagers qui sont situés en amont du TSS et inclut le TSS. Dans un premier temps, une analyse de l'ensemble des gènes montre une localisation importante de la protéine KDM5a au niveau des régions promotrices des gènes. En effet, on retrouve 52,7% et 52,8% de la protéine KDM5a dans les régions promotrices des cellules sans hormone et avec hormones respectivement. D'ailleurs, une grande proportion se situe au niveau de la région 5'UTR qui contient le TSS, c'est-à-dire 29,2% et 30% pour les cellules sans hormone et avec hormones respectivement. De plus, nos résultats montrent une faible proportion des gènes qui est occupée par la protéine KDM5a, à un endroit autre que la région promotrice. En effet, on retrouve 16,5% et 15,5% de la localisation de KDM5a au niveau de la région codante, 1,6% et 1,7% au niveau du 3'UTR pour les cellules non traitées et les cellules traitées à l'E2 respectivement.

Une analyse spécifique de certains gènes connus pour être régulés par ER $\alpha$  a été effectuée. Les résultats montrent une forte colocalisation avec les régions promotrices de ces gènes (Figure 16). Cependant, pour le gène *IGFBP4*, la présence de KDM5a n'est pas observée au promoteur dans les cellules traitées à l'E2. De plus, on observe également la présence de KDM5a dans la région codante pour le gène *BCL2*. Cette expérience nous a permis de montrer la présence de la protéine au niveau de la région promotrice des gènes.



**Figure 15 La localisation dans tout le génome de la protéine KDM5a**

A. Schéma montrant les régions analysés lors du ChIPseq de l'ensemble des gènes B. Localisation de la protéine KDM5a pour les cellules non traitées à l'E2. C. Localisation de la protéine KDM5a pour les cellules traitées à l'E2. L'analyse bioinformatique a été effectué par Khademul Islam.



**Figure 16 La localisation de KDM5a à certains gènes dépendants du ERα**  
 Capture d'écran à partir de UCSC. Les bandes noires représentent un pic d'enrichissement de la protéine KDM5a sur les gènes. Les régions promotrices de chacun des gènes sont représentés dans les cercles noirs  
 A. *BCL2* B. *EBAG9* C. *IGFBP4*

## 2.6 La localisation de la protéine KDM5a, l'ARN polII et la marque H3K4me3

Afin de déterminer si la protéine KDM5a colocalise avec des cofacteurs impliqués dans l'activation de la transcription, nous avons effectué une comparaison avec les données dans tout le génome de l'ARN polII et la marque d'histone H3K4me3 à l'aide d'outils bioinformatiques (Figure 17). Les résultats obtenus montrent une forte colocalisation de la protéine KDM5a avec l'ARN polII au niveau du TSS de l'ensemble des gènes. De plus, les résultats montrent que la marque H3K4me3 se situe de part et d'autre de la KDM5a. En effet, une baisse de la marque H3K4me3 est observée à l'endroit exactement où se situe KDM5a sur l'ensemble des gènes.

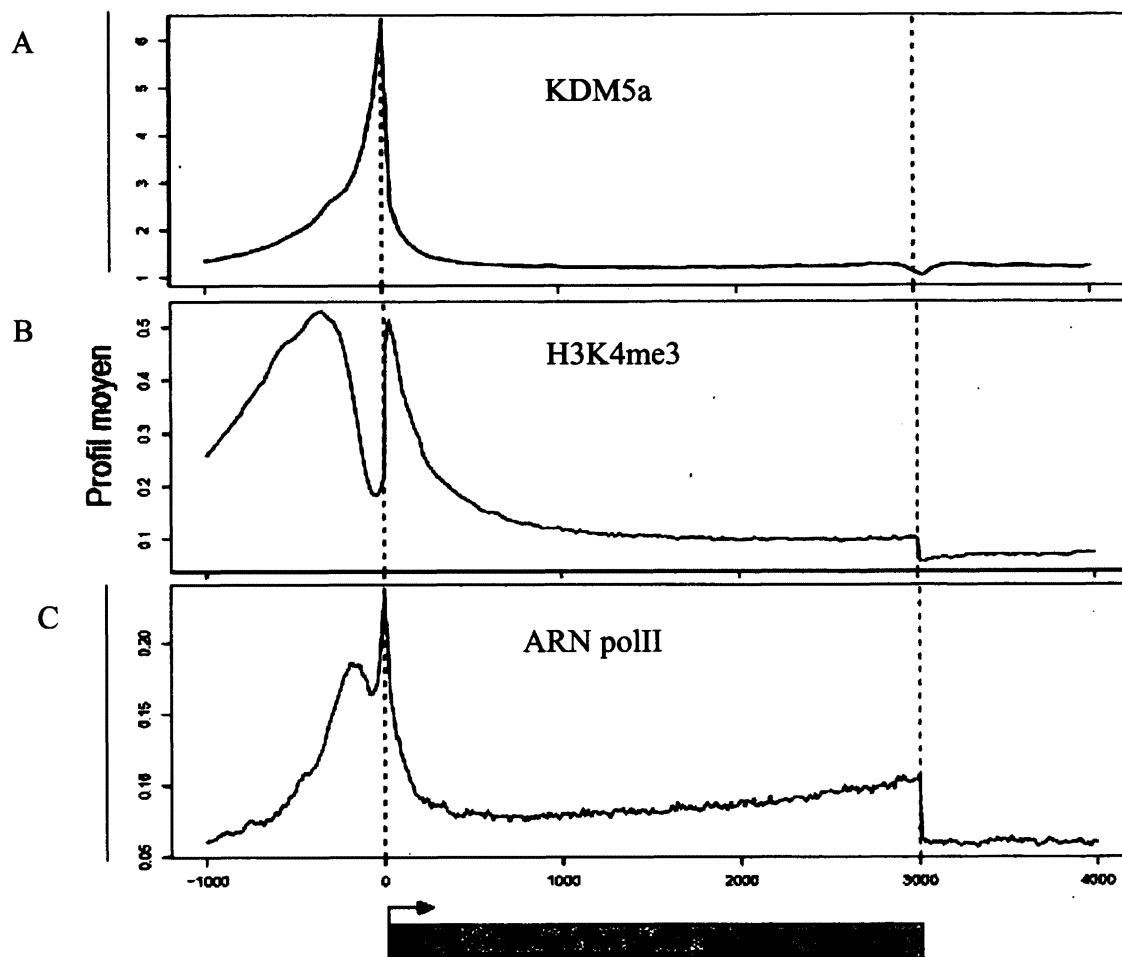
Afin de déterminer l'effet de la protéine KDM5a sur la localisation de protéines impliquées dans l'activation de la transcription, nous avons étudié le gène *TFF1*. Les essais de ChIP, effectués quatre fois, nous ont permis de visualiser la localisation pour les acteurs choisis, soit KDM5a, ERα, ARN polII, H3K4me2 et H3K4me3, dans les cellules MCF-7 (Figure 18). Les résultats confirment la présence de KDM5a au niveau du TSS du



gène (Figure 18 B). De plus, les résultats montrent la localisation de la protéine au niveau de l'« *enhancer* » du gène avant induction avec l'hormone (Figure 18B). Nous avons également vérifié la présence de ER $\alpha$  sur ce gène. Le profil de recrutement du ER $\alpha$  est bien connu sur ce gène, ce qui nous permet de l'utiliser comme contrôle de l'expérience. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature, c'est-à-dire un enrichissement, en présence de l'hormone, au niveau de la région de régulation distale, à l'ERE1 et au TSS (Figure 18C). De plus, l'enrichissement est plus abondant au niveau de la région de régulation distale comme mentionné dans les écrits. Le profil de recrutement de l'ARN polII été effectué qu'une seule fois. Pour les marques de méthylation de H3K4, les profils obtenus sont présence au niveau du TSS et en quantité moindre à la région de montre sa régulation distale et à l'ERE1 (Figure 18 D). Il faut prendre note qu'il n'a comparables au profil attendus, c'est-à-dire une localisation plus importante de H3K4me2 au niveau de la région de régulation distale et un recrutement plus important de H3K4me3 au TSS (Figure 18E-F).

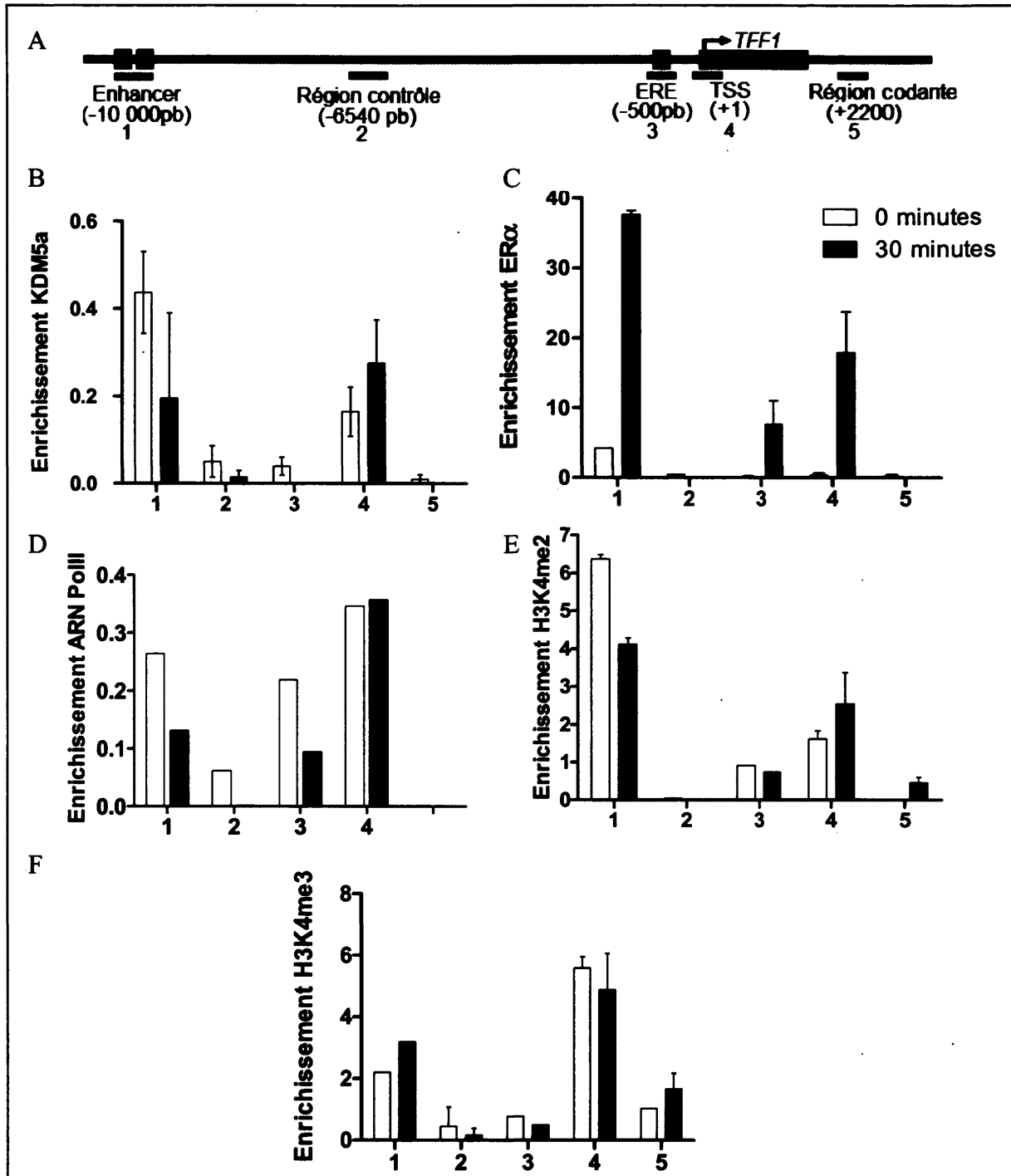
## 2.7 La déplétion de KDM5a diminue le recrutement du ER $\alpha$ , de l'ARN polII et des marques d'histones

Afin de déterminer le rôle de KDM5a sur le recrutement de ER $\alpha$ , de l'ARN polII et des marques de méthylation de H3K4, nous avons effectué un ChIP dans des cellules infectées avec le sh contrôle ou le shKDM5a1 (Figure 19). Les résultats obtenus montrent une baisse du recrutement de ces protéines sur leurs régions cibles dans les cellules infectées avec le shKDM5a 1 comparativement à celles infectées avec le sh contrôle. En effet, lorsque KDM5a n'est plus présent sur ses régions ciblent du gène *TFF1* (Figure 19A), on observe l'absence de recrutement pour ER $\alpha$  (Figure 19B). D'ailleurs, on observe une baisse importante du recrutement de l'ARN polII, surtout au TSS, pour les cellules infectées avec le shKDM5a 1 comparativement aux cellules infectées avec shCTRL (Figure 19C). Étonnamment, les marques d'histones étudiées sont affectées à la baisse lors de la diminution du recrutement de KDM5a au gène *TFF1*.

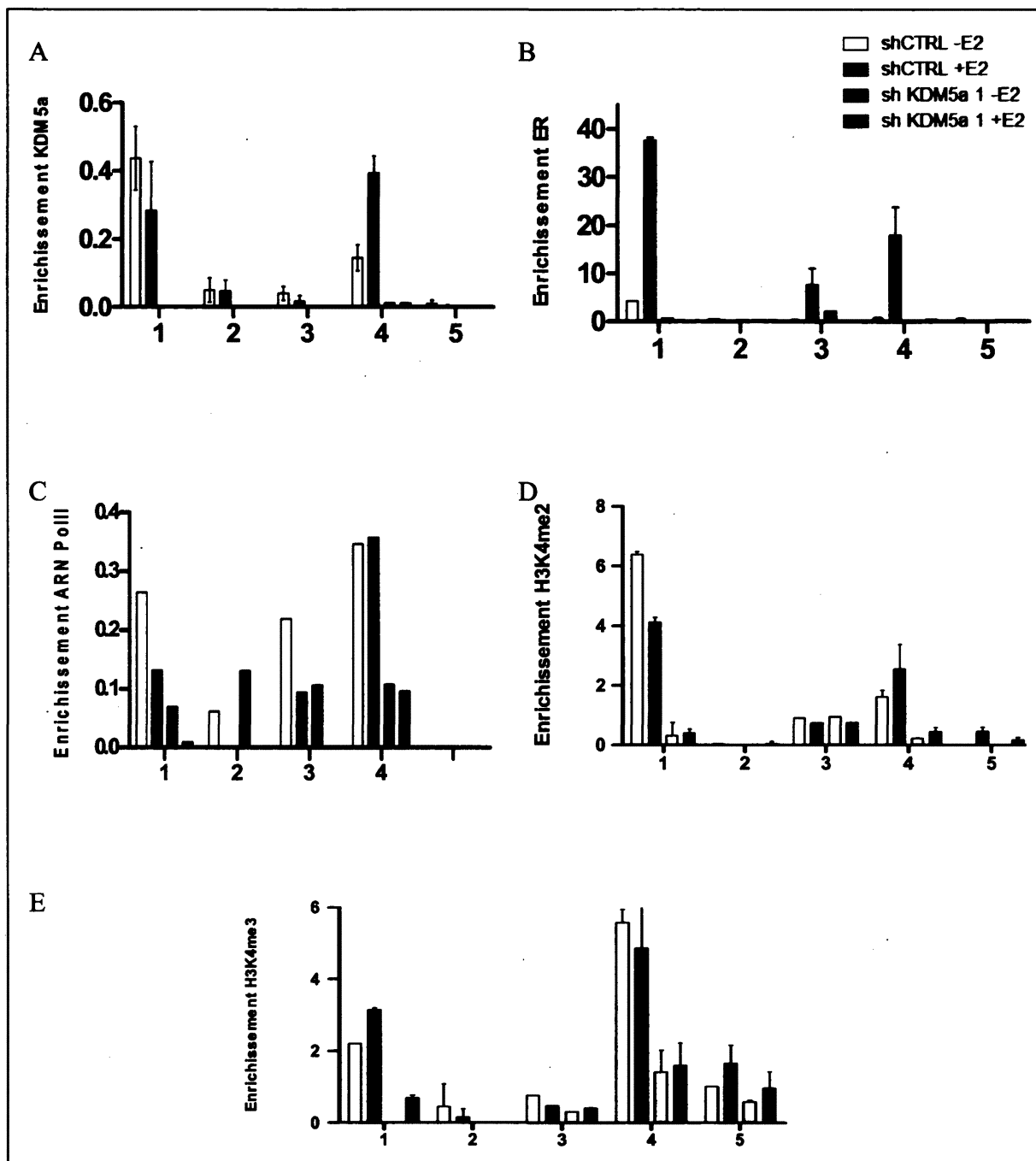


**Figure 17 La colocalisation de la protéine KDM5a avec H3K4me3 et l'ARN polII autour du TSS pour l'ensemble du génome**  
 Profil moyen dans tout le génome autour de la région du TSS (-1Kb à +4Kb) A : KDM5a. B : H3K4me3. C: ARN polII. Les données pour H3K4me3 et ARN polII proviennent de (Joseph et al., 2010).

En effet, une baisse importante du recrutement de la marque H3K4me2 est observable au niveau de l'« *enhancer* » du gène *TFF1* pour les cellules infectées avec le shKDM5a1 comparativement aux cellules infectées avec sh contrôle (Figure 19D). Cette baisse n'est pas présente à l'ERE1 et au TSS puisque l'enrichissement est comparable pour les cellules infectées avec le sh contrôle ou le shKDM5a1. De plus, une baisse de recrutement de H3K4me3 est obtenue au TSS et à l'« *enhancer* » à la suite de l'infection des cellules avec le shKDM5a1 et n'est pas observée au niveau du ERE1 (Figure 19E).



**Figure 18** L'analyse par ChIP des régions régulatrices du gène *TFF1* dans les cellules MCF-7  
 La chromatine a été isolée de cellules MCF-7 traitées avec E2 (bandes noires) ou non (bandes blanches) pour 30 min. L'ADN a été analysée par PCR quantitatif. Les expériences ont été effectuées trois fois chacune sauf pour l'ARN polII qui a été effectué une fois. A. Schéma représentant les régions régulatrices étudiées. Les rectangles bleus montrent les régions amplifiées par les amorces. B. ChIP KDM5a. C. ChIP ERα. D. ChIP ARN polII. E. ChIP H3K4me2. F. ChIP H3K4me3.



**Figure 19 La protéine KDM5a affecte le recrutement du ER $\alpha$ , de l'ARN polII et des marques d'histones aux régions régulatrices du gène *TFF1* dans les cellules MCF-7.**

La construction shKDM5a 1 a été utilisée afin de diminuer l'expression de la protéine KDM5a (bandes rose pâle et rose foncé). Une construction contrôle a été utilisée (bandes blanches et noires). La chromatine a été isolée de cellules MCF-7 traitées avec E2 pour 30 min (bandes noires et rose foncé) ou non traitées (bandes blanches et rose pâle). L'ADN a été analysé par PCR quantitatif. Les expériences ont été effectuées trois fois chacune sauf pour l'ARN polII qui a été effectué une fois. A. ChIP KDM5a B. ChIP ER $\alpha$  C. ChIP ARN polII D. ChIP H3K4me2 E. H3K4me3

## **CHAPITRE 3**

### **DICUSSION**

Le recrutement de certains facteurs au niveau de la chromatine nécessite l'existence de modifications post-traductionnelles des extrémités N-terminales des histones et de protéines déjà liées. Les modifications des histones permettent le recrutement de protéines effectrices qui agissent sur l'état transcriptionnel de la chromatine. De plus, ER $\alpha$  affectent l'expression génique par le recrutement des corégulateurs de la transcription qui modifient la structure chromatinienne (Dilworth and Chambon, 2001). Un dérèglement au niveau de la localisation de ces complexes cause des changements aberrants de la structure de la chromatine, pouvant conduire à des modifications de l'expression de certains gènes. Parmi les protéines retrouvées au niveau de ces complexes, les enzymes qui agissent sur la modification de l'histone H3 au niveau de la lysine 4 (H3K4) jouent un rôle essentiel afin de réguler l'expression des gènes cibles du ER $\alpha$ . La protéine KDM5a, qui appartient à la famille JARID1, agit spécifiquement sur H3K4me2/me3. Les résultats présentés dans ce mémoire montrent le rôle Coactivateur de la déméthylase KDM5a lors de l'expression des gènes régulés par ER $\alpha$ .

#### **3.1 KDM5a et ER $\alpha$ .**

Il a été démontré que certaines méthyltransférases, des complexes MLL 1 à 4 (Mixed Lineage Leukemia), interagissent avec ER $\alpha$  et sont impliquées dans l'activation de ces gènes cibles (Mo et al., 2006). Récemment, la découverte d'enzymes possédant une activité déméthylase agissant sur les résidus lysine des histones démontre une dynamique plus complexe des modifications épigénétiques (Metzger et al., 2005; Shi et al., 2004). La protéine KDM5a, une déméthylase de la famille JARID1, agit spécifiquement sur

H3K4me2/me3. Il est connu que KDM5a peut interagir directement avec le domaine de liaison à l'ADN de ER $\alpha$  suggérant un rôle de Coactivateur (Chan and Hong, 2001).

Dans cette étude, nous avons montré que l'expression de la protéine KDM5a ainsi que sa colocalisation avec ER  $\alpha$  ne sont pas régulées par l'E2. En effet, on observe la présence de la protéine KDM5a au niveau de la région promotrice de l'ensemble des gènes, autant dans les cellules traitées que dans celles non traitées avec l'E2. De plus, les résultats obtenus ne montrent pas de variation dans l'expression de la protéine à la suite de l'induction des cellules avec l'œstrogène. Néanmoins, la diminution de l'expression de la protéine KDM5a occasionne une perte de recrutement du ER $\alpha$  au niveau de ses éléments de réponse sur le gène *TFF1*. La perte de recrutement du ER $\alpha$  était attendue puisque son interaction avec la protéine KDM5a a été démontrée (Chan and Hong, 2001). Par conséquent, ce résultat suggère que la protéine KDM5a pourrait être nécessaire à la localisation du ER  $\alpha$ . De plus, ce résultat est en accord avec la diminution de l'expression des gènes régulés par ER $\alpha$  qui est observée subséquemment à la diminution de l'expression de la protéine KDM5a.

### **3.2 KDM5a et la déméthylation de H3K4me2/me3**

Les résultats obtenus par l'immunoprécipitation de la chromatine suivi du séquençage montrent la présence de la protéine KDM5a au niveau de la région promotrice des gènes et plus précisément au niveau du site de départ de la transcription. L'analyse des données de l'ARN polII et la marque de méthylation H3K4me3 montrent une colocalisation, dans tout le génome, avec KDM5a au niveau du TSS. Il est connu que H3K4me3 et l'ARN polII sont retrouvés au niveau des gènes qui sont transcrits. Par conséquent, ce résultat suggère un rôle dans l'activation de la transcription.

Les résultats de localisation obtenus à la suite de la diminution de KDM5a sont à tout le moins étonnants. En effet, l'analyse de l'immunoprécipitation de la chromatine montre la perte des marques d'histones H3K4me2/me3 au niveau de leurs régions cibles sur le gène *TFF1*, lorsque KDM5a n'est plus présent. Par ailleurs, il est bien connu que la protéine déméthylase KDM5a a pour substrat H3K4me3/me2 (Christensen et al., 2007; Hayakawa et al., 2007; Klose et al., 2007; Lopez-Bigas et al., 2008). Par conséquent, la perte d'expression de la protéine KDM5a devrait conduire à une augmentation des marques H3K4me3/me2 alors que les résultats de notre étude montrent le contraire.

Les connaissances sur la régulation de l'activité des protéines déméthylases dans le noyau sont peu étendues. La question de la spécificité du substrat demeure toujours afin de bien comprendre la fonction des protéines déméthylases. En effet, il est maintenant connu que la déméthylase LSD1 agit sur différentes marques d'histones selon son environnement. En effet, cette déméthylase peut retirer spécifiquement les marques H3K4me2/me1 en utilisant une réaction oxydative dépendante de FAD (flavine adénine dinucléotide) (Shi et al., 2004). La déméthylation de H3K4 est associée à la répression de la transcription. Par ailleurs, LSD1 est connue pour être associée avec des complexes d'histones déacétylases (Hakimi et al., 2002; Jones and Shi, 2003; You et al., 2001). Néanmoins, LSD1 change de substrat dans un contexte qui fait intervenir le récepteur de l'androgène ou les récepteurs de l'oestrogènes (Shi et al., 2004). En effet, LSD1 change sa cible pour H3K9me2 et n'a plus d'effet sur les marques H3K4me2/me1 (Shi et al., 2004). Ce changement de substrat, qui lui permet de passer de corépresseur à Coactivateur de la transcription, suggère que les récepteurs nucléaires peuvent moduler la spécificité de LSD1 (Metzger et al., 2005). Les mécanismes par lequel LSD1 change de cible ne sont pas connus. Toutefois, LSD1 n'est pas la seule déméthylase dont l'activité est affectée par les récepteurs nucléaires. En plus de LSD1, il est connu que le récepteur des androgènes peut interagir avec les déméthylases KDM3A/JHDM2A (Okada et al., 2007; Yamane et al., 2006), KDM4C/JMJD2C (Wissmann et al., 2007) et KDM5b (Xiang et al., 2007). Par conséquent, les récepteurs nucléaires peuvent moduler l'activité des déméthylases et ainsi permettre une régulation transcriptionnelle. En outre, l'association

de la protéine KDM5b avec le récepteur de l'androgène améliore l'activation transcriptionnelle induite par ce récepteur (Xiang et al., 2007). Ainsi, la possibilité que la protéine KDM5a agisse sur une marque autre que H3K4me2/me3 dans un contexte impliquant les récepteurs nucléaires est à considérer.

### **3.3 Les mécanismes de régulation de l'activité enzymatique**

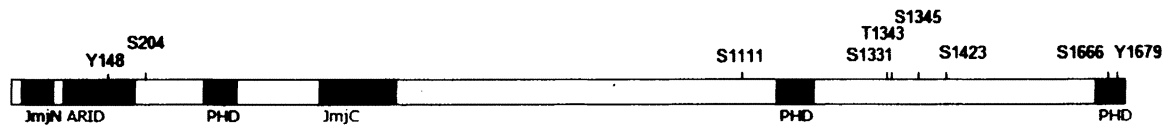
Les mécanismes qui permettent la régulation de ces enzymes déméthylases au sein du noyau sont peu connus. Néanmoins, deux mécanismes ont été suggérés, soit la régulation par l'association à des facteurs auxiliaires et la modification post-traductionnelle de la déméthylase (Mosammaparast and Shi, 2010). Un bon exemple de déméthylases qui s'associent à des facteurs auxiliaires est celui de KDM5b. Cette déméthylase appartient à la famille JARID. Comme toutes les déméthylases de cette famille, elle agit sur les marques de H3K4me3/me2 (Christensen et al., 2007; Secombe and Eisenman, 2007; Xiang et al., 2007; Yamane et al., 2007). Cependant, l'association de KDM5b avec le facteur de transcription c-Myc inhibe l'activité déméthylase de la protéine KDM5b et lui permet d'agir comme un CoA en contribuant à induire la croissance cellulaire (Secombe and Eisenman, 2007).

Pour KDM5a, plusieurs interactions protéine-protéine ont été démontrées, dont celle avec la protéine TBP (Kim et al., 1994). Son interaction avec TBP pourrait favoriser la formation du complexe de préinitiation de la transcription ce qui lui conférerait un rôle de Coactivateur. D'ailleurs, il est connu que la marque de méthylation H3K4me3 vient après la formation du complexe de préinitiation de la transcription, suggérant ainsi son rôle dans le maintien de la transcription plutôt que son initiation (Pavri et al., 2006). De plus, considérant que KDM5a interagit avec TBP pour la formation du complexe de préinitiation de la transcription, il est logique de voir la marque de méthylation de H3K4me3 diminuer après la déplétion de KDM5a.



La phosphorylation est une modification très commune des protéines des cellules animales. La grande majorité des phosphorylations se produisent en tant que mécanisme important par lequel l'activité des facteurs de transcription peut être régulée. L'œstrogène agit sur les cellules par l'intermédiaire des récepteurs aux œstrogènes. Le récepteur à l'œstrogène couplé à la protéine G (GPR30) est connu pour induire des cascades de phosphorylation (Filardo et al., 2000; Filardo et al., 2002; Hsieh et al., 2007). En effet, on sait que la liaison de l'œstrogène avec GPR30 déclenche l'activation rapide mais transitoire de la MAPK, extracellulaire signal-regulated kinase (Erk) -1 et Erk-2 (Filardo et al., 2000; Filardo et al., 2002). De plus, il est connu que GPR30 agit de façon indépendante de l'ER afin de promouvoir l'activation de la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA) qui protège les cellules contre l'apoptose (Hsieh et al., 2007). Également, d'autres études ont montré que les récepteurs à l'oestrogène peuvent promouvoir l'activation des MAPK (Dai et al., 2007; Improt-Brears et al., 1999; Migliaccio et al., 1996; Watters et al., 1997). Donc, il est probable que l'activation des cascades de phosphorylation agisse sur d'autres protéines telles que la déméthylase KDM5a.

La modification post-traductionnelle des déméthylases n'a pas été très étudiée jusqu'à présent. Par contre, il est maintenant connu que la protéine KDM5a possède plusieurs sites potentiels de phosphorylation (figure 19) (Beausoleil et al., 2004; Huttlin et al., 2010; Malik et al., 2009; Mayya et al., 2009; Olsen et al., ; Rikova et al., 2007). Ces résidus pourraient jouer un rôle clé dans la régulation de l'activité enzymatique de la protéine. L'activation des cascades de phosphorylation induite par l'œstrogène via le récepteur GPR30 pourrait agir à ce niveau. En effet, cette modification post-traductionnelle pourrait modifier soit la cible de la protéine en lui permettant d'agir sur une autre marque, soit empêcher son activité déméthylase.



**Figure 20 Sites de phosphorylation sur la protéine KDM5a.**

Résidus phosphorylables de la protéine KDM5a. Les domaines Jmj qui possèdent l'activité catalytique sont représentés par les rectangles vert et rouge. Le domaine ARID qui permet la liaison à l'ADN est représenté par le rectangle mauve. Un site de phosphorylation est présent dans ce domaine. Les domaines PHD nécessaires pour la liaison aux histones méthylées sont représentés par les rectangles bleus où deux sites de phosphorylation sont présents. Image modifiée de PhosphositePlus

Les connaissances sur les protéines déméthylases sont encore très restreintes. Cependant, on sait que la phosphorylation d'une protéine peut avoir un impact sur son activité, et ce, selon le résidu phosphorylé. C'est le cas de la protéine « *enhancer of zeste homolog 2* » (EZH2), une méthyltransférase qui permet la triméthylation de H3K27 et le silençage des gènes (Cao et al., 2002; Etchegaray et al., 2006; Kuzmichev et al., 2002; Wang et al.). Les fonctions de cette protéine sont nombreuses : prolifération cellulaire, inhibition de la différenciation cellulaire et progression du cancer (Fujii et al., 2008; Kodach et al., ; Shen et al., 2009). Il a été démontré que cette protéine peut être phosphorylée sur plusieurs résidus. La phosphorylation de la thréonine 350 par les protéines kinases dépendantes des cyclines, CDK1 et CDK2, permet le maintien de H3K27me3 (Chen et al., 2010). Par contre, la phosphorylation de la thréonine 487, par CDK1, inhibe son activité méthyltransférase en empêchant sa liaison avec les protéines SUZ12 et EED qui font partie du complexe répresseur PRC2 (*polycomb repressive complex*) (Wei et al.). De plus, une phosphorylation de la serine 21, par la voie AKT, diminue son action sur H3K27 en empêchant sa liaison avec H3K27 (Cha et al., 2005).

## **CHAPITRE 4**

### **CONCLUSION**

Dans cette étude, nous avons montré un rôle de la protéine KDM5a dans un modèle qui fait intervenir le récepteur nucléaire ER $\alpha$ . Cependant, le mécanisme utilisé par la protéine afin de jouer son rôle de coactivateur n'a pas été abordé. Une analyse par Microarray a été effectuée avec des cellules MCF-7 contrôles ou déplétées en KDM5a. L'analyse des résultats dans tout le génome donnera sans doute des indications sur le mécanisme utilisé par la protéine. En effet, cette analyse indiquera les gènes dont l'expression est affectée par la protéine KDM5a. De ce fait, il sera possible de cibler des complexes protéiques ou des voies de signalisation connues qui seront affectées par la protéine KDM5a. Également, il serait essentiel de vérifier si l'activité déméthylase de la protéine est nécessaire afin qu'elle joue son rôle de coactivateur. Nous avons au laboratoire deux constructions d'ADN plasmidique qui permettent la surexpression de la protéine native ou avec une mutation dans son domaine catalytique. Ainsi, l'utilisation de ces constructions, à des fins d'analyses de l'expression des gènes par RT-qPCR, pourra donner une réponse quant à la nécessité d'un domaine catalytique fonctionnel lors de l'activation des gènes. Aussi, il serait intéressant de vérifier si la protéine KDM5a pourrait agir sur une marque histone autre que H3K4me2/me3 lorsqu'elle est en présence du récepteur de l'œstrogène  $\alpha$ . Une expérience de ChIP en utilisant des anticorps pour la détection des marques d'histones pourrait répondre à la question. Finalement, l'identification du complexe d'interaction protéique, dont fait partie KDM5a, permettrait aussi de clarifier son mécanisme d'action. L'analyse du complexe protéique par spectrométrie de masse permettrait quant à elle d'identifier les composants du complexe.

## BIBLIOGRAPHIE

(2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431, 931-945.

Aasland, R., Gibson, T.J., and Stewart, A.F. (1995). The PHD finger: implications for chromatin-mediated transcriptional regulation. *Trends in biochemical sciences* 20, 56-59.

Adam, M., Robert, F., Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2001). H2A.Z is required for global chromatin integrity and for recruitment of RNA polymerase II under specific conditions. *Molecular and cellular biology* 21, 6270-6279.

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Molecular cell* 9, 1191-1200.

Ali, S., Metzger, D., Bornert, J.M., and Chambon, P. (1993). Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region. *The EMBO journal* 12, 1153-1160.

Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51, 786-794.

Allis, C.D., Bowen, J.K., Abraham, G.N., Glover, C.V., and Gorovsky, M.A. (1980). Proteolytic processing of histone H3 in chromatin: a physiologically regulated event in *Tetrahymena* micronuclei. *Cell* 20, 55-64.

Andang, M., Hjerling-Leffler, J., Moliner, A., Lundgren, T.K., Castelo-Branco, G., Nanou, E., Pozas, E., Bryja, V., Halliez, S., Nishimaru, H., *et al.* (2008). Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* 451, 460-464.

Anderson, E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res* 4, 197-201.

Aranda, A., and Pascual, A. (2001). Nuclear hormone receptors and gene expression. *Physiological reviews* 81, 1269-1304.

Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E., and Moudrianakis, E.N. (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly

and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 10148-10152.

Balciunas, D., and Ronne, H. (2000). Evidence of domain swapping within the jumonji family of transcription factors. *Trends in biochemical sciences* 25, 274-276.

Bao, Y., and Shen, X. (2007). INO80 subfamily of chromatin remodeling complexes. *Mutation research* 618, 18-29.

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129, 823-837.

Bateman, A., Birney, E., Durbin, R., Eddy, S.R., Howe, K.L., and Sonnhammer, E.L. (2000). The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res* 28, 263-266.

Beausoleil, S.A., Jedrychowski, M., Schwartz, D., Elias, J.E., Villen, J., Li, J., Cohn, M.A., Cantley, L.C., and Gygi, S.P. (2004). Large-scale characterization of HeLa cell nuclear phosphoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 12130-12135.

Belandia, B., Orford, R.L., Hurst, H.C., and Parker, M.G. (2002). Targeting of SWI/SNF chromatin remodelling complexes to estrogen-responsive genes. *The EMBO journal* 21, 4094-4103.

Benevolenskaya EV, M.H., Branton P, et al. ( 2005 ). Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation. *Mol Cell* 18 623-635.

Benevolenskaya, E.V., Murray, H.L., Branton, P., Young, R.A., and Kaelin, W.G., Jr. (2005). Binding of pRB to the PHD protein RBP2 promotes cellular differentiation. *Molecular cell* 18, 623-635.

Bernstein, B.E., Humphrey, E.L., Erlich, R.L., Schneider, R., Bouman, P., Liu, J.S., Kouzarides, T., and Schreiber, S.L. (2002). Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 8695-8700.

Bohm, J., Schlaeger, E.J., and Knippers, R. (1980). Acetylation of nucleosomal histones in vitro. *Eur J Biochem* 112, 353-362.

Briggs, S.D., Bryk, M., Strahl, B.D., Cheung, W.L., Davie, J.K., Dent, S.Y., Winston, F., and Allis, C.D. (2001). Histone H3 lysine 4 methylation is mediated by Set1 and required for cell growth and rDNA silencing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* 15, 3286-3295.

Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.

Burke, L.J., and Baniahmad, A. (2000). Co-repressors 2000. *Faseb J* 14, 1876-1888.

Byvoet, P., Shepherd, G.R., Hardin, J.M., and Noland, B.J. (1972). The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultured mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 148, 558-567.

Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science (New York, NY)* 298, 1039-1043.

Carmen, A.A., Rundlett, S.E., and Grunstein, M. (1996). HDA1 and HDA3 are components of a yeast histone deacetylase (HDA) complex. *The Journal of biological chemistry* 271, 15837-15844.

Cha, T.L., Zhou, B.P., Xia, W., Wu, Y., Yang, C.C., Chen, C.T., Ping, B., Otte, A.P., and Hung, M.C. (2005). Akt-mediated phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of lysine 27 in histone H3. *Science (New York, NY)* 310, 306-310.

Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M., and Evans, R.M. (1996). Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 383, 99-103.

Chan, S.W., and Hong, W. (2001). Retinoblastoma-binding protein 2 (Rbp2) potentiates nuclear hormone receptor-mediated transcription. *The Journal of biological chemistry* 276, 28402-28412.

Chen, J.D., and Evans, R.M. (1995). A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature* 377, 454-457.

Chen, S., Bohrer, L.R., Rai, A.N., Pan, Y., Gan, L., Zhou, X., Bagchi, A., Simon, J.A., and Huang, H. (2010). Cyclin-dependent kinases regulate epigenetic gene silencing through phosphorylation of EZH2. *Nature cell biology* 12, 1108-1114.

Chen, Z., Zang, J., Whetstone, J., Hong, X., Davrazou, F., Kutateladze, T.G., Simpson, M., Mao, Q., Pan, C.H., Dai, S., *et al.* (2006). Structural insights into histone demethylation by JMJD2 family members. *Cell* 125, 691-702.

Chimento, A., Sirianni, R., Delalande, C., Silandre, D., Bois, C., Ando, S., Maggiolini, M., Carreau, S., and Pezzi, V. (2010). 17 beta-estradiol activates rapid signaling pathways involved in rat pachytene spermatocytes apoptosis through GPR30 and ER alpha. *Mol Cell Endocrinol* 320, 136-144.

Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A., Pasini, D., Rose, S., Sennels, L., Rappsilber, J., Hansen, K.H., Salcini, A.E., and Helin, K. (2007). RBP2 belongs to a family of demethylases, specific for tri- and dimethylated lysine 4 on histone 3. *Cell* 128, 1063-1076.

Corpet, F., Servant, F., Gouzy, J., and Kahn, D. (2000). ProDom and ProDom-CG: tools for protein domain analysis and whole genome comparisons. *Nucleic Acids Res* 28, 267-269.

Couse, J.F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J. A., and Korach, K. S. (1997). *Endocrinology* 138, 4613-4621.

Craig, J.M. (2005). Heterochromatin--many flavours, common themes. *Bioessays* 27, 17-28.

Cui, Y., Zhang, M., Pestell, R., Curran, E.M., Welshons, W.V., and Fuqua, S.A. (2004). Phosphorylation of estrogen receptor alpha blocks its acetylation and regulates estrogen sensitivity. *Cancer Res* 64, 9199-9208.

Dai, Z., Li, Y., Quarles, L.D., Song, T., Pan, W., Zhou, H., and Xiao, Z. (2007). Resveratrol enhances proliferation and osteoblastic differentiation in human mesenchymal stem cells via ER-dependent ERK1/2 activation. *Phytomedicine* 14, 806-814.

Decristofaro, M.F., Betz, B.L., Rorie, C.J., Reisman, D.N., Wang, W., and Weissman, B.E. (2001). Characterization of SWI/SNF protein expression in human breast cancer cell lines and other malignancies. *Journal of cellular physiology* 186, 136-145.

Defeo-Jones D, H.P., Jones RE, Haskell KM, Vuocolo GA, Hanobik MG, Huber HE, Oliff A (1991). Cloning of cDNAs for cellular proteins that bind to the retinoblastoma gene product. *Nature* 352 251-254.

Deng, W., and Roberts, S.G. (2005). A core promoter element downstream of the TATA box that is recognized by TFIIB. *Genes & development* 19, 2418-2423.

Dhillon, N., and Kamakaka, R.T. (2000). A histone variant, Htz1p, and a Sir1p-like protein, Esc2p, mediate silencing at HMR. *Molecular cell* 6, 769-780.

Dilworth, F.J., and Chambon, P. (2001). Nuclear receptors coordinate the activities of chromatin remodeling complexes and coactivators to facilitate initiation of transcription. *Oncogene* 20, 3047-3054.

Eberharter, A., and Becker, P.B. (2004). ATP-dependent nucleosome remodelling: factors and functions. *J Cell Sci* 117, 3707-3711.

Edwards, D.P. (2005). Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annual review of physiology* 67, 335-376.

Etchegaray, J.P., Yang, X., DeBruyne, J.P., Peters, A.H., Weaver, D.R., Jenuwein, T., and Reppert, S.M. (2006). The polycomb group protein EZH2 is required for mammalian circadian clock function. *The Journal of biological chemistry* 281, 21209-21215.

Fattaey, A.R., Helin, K., Dembski, M.S., Dyson, N., Harlow, E., Vuocolo, G.A., Hanobik, M.G., Haskell, K.M., Oliff, A., Defeo-Jones, D., *et al.* (1993). Characterization of the retinoblastoma binding proteins RBP1 and RBP2. *Oncogene* 8, 3149-3156.

Fernandez-Capetillo, O., Mahadevaiah, S.K., Celeste, A., Romanienko, P.J., Camerini-Otero, R.D., Bonner, W.M., Manova, K., Burgoyne, P., and Nussenzweig, A. (2003). H2AX is required for chromatin remodeling and inactivation of sex chromosomes in male mouse meiosis. *Developmental cell* 4, 497-508.

Filardo, E.J., Quinn, J.A., Bland, K.I., and Frackelton, A.R., Jr. (2000). Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14, 1649-1660.



- Filardo, E.J., Quinn, J.A., Frackelton, A.R., Jr., and Bland, K.I. (2002). Estrogen action via the G protein-coupled receptor, GPR30: stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated attenuation of the epidermal growth factor receptor-to-MAPK signaling axis. *Mol Endocrinol* 16, 70-84.
- Filion, G.J., van Bommel, J.G., Braunschweig, U., Talhout, W., Kind, J., Ward, L.D., Brugman, W., de Castro, I.J., Kerkhoven, R.M., Bussemaker, H.J., *et al.* (2010). Systematic protein location mapping reveals five principal chromatin types in *Drosophila* cells. *Cell* 143, 212-224.
- Fujii, S., Ito, K., Ito, Y., and Ochiai, A. (2008). Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation. *The Journal of biological chemistry* 283, 17324-17332.
- Gevry, N., Chan, H.M., Laflamme, L., Livingston, D.M., and Gaudreau, L. (2007). p21 transcription is regulated by differential localization of histone H2A.Z. *Genes & development* 21, 1869-1881.
- Gevry, N., Hardy, S., Jacques, P.E., Laflamme, L., Svtelis, A., Robert, F., and Gaudreau, L. (2009). Histone H2A.Z is essential for estrogen receptor signaling. *Genes & development* 23, 1522-1533.
- Glass, C.K., Rose, D.W., and Rosenfeld, M.G. (1997). Nuclear receptor coactivators. *Curr Opin Cell Biol* 9, 222-232.
- Graff, J., Kim, D., Dobbin, M.M., and Tsai, L.H. (2011). Epigenetic regulation of gene expression in physiological and pathological brain processes. *Physiological reviews* 91, 603-649.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., and Chambon, P. (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-139.
- Guenther, M.G., Levine, S.S., Boyer, L.A., Jaenisch, R., and Young, R.A. (2007). A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* 130, 77-88.
- Gutierrez, J., Paredes, R., Cruzat, F., Hill, D.A., van Wijnen, A.J., Lian, J.B., Stein, G.S., Stein, J.L., Imbalzano, A.N., and Montecino, M. (2007). Chromatin remodeling by

SWI/SNF results in nucleosome mobilization to preferential positions in the rat osteocalcin gene promoter. *The Journal of biological chemistry* 282, 9445-9457.

Hakimi, M.A., Bochar, D.A., Chenoweth, J., Lane, W.S., Mandel, G., and Shiekhattar, R. (2002). A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 7420-7425.

Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C., and Brown, M. (1994). Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science (New York, NY)* 264, 1455-1458.

Hall, J.M., Couse, J.F., and Korach, K.S. (2001). The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 276, 36869-36872.

Hanstein, B., Eckner, R., DiRenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R., and Brown, M. (1996). p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 11540-11545.

Hatzis, P., and Talianidis, I. (2002). Dynamics of enhancer-promoter communication during differentiation-induced gene activation. *Molecular cell* 10, 1467-1477.

Hayakawa, T., Ohtani, Y., Hayakawa, N., Shinmyozu, K., Saito, M., Ishikawa, F., and Nakayama, J. (2007). RBP2 is an MRG15 complex component and down-regulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation. *Genes Cells* 12, 811-826.

Hofmann, K., Bucher, P., Falquet, L., and Bairoch, A. (1999). The PROSITE database, its status in 1999. *Nucleic Acids Res* 27, 215-219.

Honda, B.M., Dixon, G.H., and Candido, E.P. (1975). Sites of in vivo histone methylation in developing trout testis. *The Journal of biological chemistry* 250, 8681-8685.

Hori, R., and Carey, M. (1994). The role of activators in assembly of RNA polymerase II transcription complexes. *Current opinion in genetics & development* 4, 236-244.

Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., *et al.* (1995). Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature* 377, 397-404.

Hsieh, Y.C., Yu, H.P., Frink, M., Suzuki, T., Choudhry, M.A., Schwacha, M.G., and Chaudry, I.H. (2007). G protein-coupled receptor 30-dependent protein kinase A pathway is critical in nongenomic effects of estrogen in attenuating liver injury after trauma-hemorrhage. *The American journal of pathology* 170, 1210-1218.

Huttlin, E.L., Jedrychowski, M.P., Elias, J.E., Goswami, T., Rad, R., Beausoleil, S.A., Villen, J., Haas, W., Sowa, M.E., and Gygi, S.P. (2010). A tissue-specific atlas of mouse protein phosphorylation and expression. *Cell* 143, 1174-1189.

Improta-Brears, T., Whorton, A.R., Codazzi, F., York, J.D., Meyer, T., and McDonnell, D.P. (1999). Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 4686-4691.

Inano, K., Curtis, S.W., Korach, K.S., Omata, S., and Horigome, T. (1994). Heat shock protein 90 strongly stimulates the binding of purified estrogen receptor to its responsive element. *J Biochem* 116, 759-766.

Iwase, S., Lan, F., Bayliss, P., de la Torre-Ubieta, L., Huarte, M., Qi, H.H., Whetstine, J.R., Bonni, A., Roberts, T.M., and Shi, Y. (2007). The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell* 128, 1077-1088.

Jensen, E.V. (1962). On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* 6, 47-59.

Jensen, L.R., Amende, M., Gurok, U., Moser, B., Gimmel, V., Tzschach, A., Janecke, A.R., Tariverdian, G., Chelly, J., Fryns, J.P., *et al.* (2005). Mutations in the JARID1C gene, which is involved in transcriptional regulation and chromatin remodeling, cause X-linked mental retardation. *Am J Hum Genet* 76, 227-236.

Jenuwein, T., and Allis, C.D. (2001). Translating the histone code. *Science (New York, NY)* 293, 1074-1080.

Jerzmanowski, A. (2007). SWI/SNF chromatin remodeling and linker histones in plants. *Biochimica et biophysica acta* 1769, 330-345.

Johnson, K., Pflugh, D.L., Yu, D., Hesslein, D.G., Lin, K.I., Bothwell, A.L., Thomas-Tikhonenko, A., Schatz, D.G., and Calame, K. (2004). B cell-specific loss of histone 3 lysine 9 methylation in the V(H) locus depends on Pax5. *Nat Immunol* 5, 853-861.

Johnston, H., Kneer, J., Chackalaparampil, I., Yaciuk, P., and Chrivia, J. (1999). Identification of a novel SNF2/SWI2 protein family member, SRCAP, which interacts with CREB-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 274, 16370-16376.

Jones, P.L., and Shi, Y.B. (2003). N-CoR-HDAC corepressor complexes: roles in transcriptional regulation by nuclear hormone receptors. *Current topics in microbiology and immunology* 274, 237-268.

Joseph, R., Orlov, Y.L., Huss, M., Sun, W., Kong, S.L., Ukil, L., Pan, Y.F., Li, G., Lim, M., Thomsen, J.S., *et al.* (2010). Integrative model of genomic factors for determining binding site selection by estrogen receptor- $\alpha$ . *Molecular systems biology* 6, 456.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science (New York, NY)* 270, 1491-1494.

Keith Orford, P.K., Weil Lai, Maria Carlota Dao, David J. Worhunsky, Adam Ferro, Viktor Janzen, Peter J. Park, and David T. Scadden (2008). Differential H3K4 Methylation Identifies Developmentally Poised Hematopoietic Genes. *Developmental Cell* 14, 798-809.

Kim, S., Benoiton, L., and Paik, W.K. (1964). Epsilon-Alkyllysine. Purification and Properties of the Enzyme. *The Journal of biological chemistry* 239, 3790-3796.

Kim, Y.J., and Lis, J.T. (2005). Interactions between subunits of *Drosophila* Mediator and activator proteins. *Trends in biochemical sciences* 30, 245-249.

Kim, Y.W., Otterson, G.A., Kratzke, R.A., Coxon, A.B., and Kaye, F.J. (1994). Differential specificity for binding of retinoblastoma binding protein 2 to RB, p107, and TATA-binding protein. *Molecular and cellular biology* 14, 7256-7264.

Klein-Hitpass, L., Schorpp, M., Wagner, U., and Ryffel, G.U. (1986). An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus* vitellogenin A2 gene functions in transfected human cells. *Cell* 46, 1053-1061.

- Klinge, C.M. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucleic Acids Res* 29, 2905-2919.
- Klose, R.J., Kallin, E.M., and Zhang, Y. (2006). JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nat Rev Genet* 7, 715-727.
- Klose, R.J., Yan, Q., Tothova, Z., Yamane, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Gilliland, D.G., Zhang, Y., and Kaelin, W.G., Jr. (2007). The retinoblastoma binding protein RBP2 is an H3K4 demethylase. *Cell* 128, 889-900.
- Kodach, L.L., Jacobs, R.J., Heijmans, J., van Noesel, C.J., Langers, A.M., Verspaget, H.W., Hommes, D.W., Offerhaus, G.J., van den Brink, G.R., and Hardwick, J.C. The role of EZH2 and DNA methylation in the silencing of the tumour suppressor RUNX3 in colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31, 1567-1575.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 5925-5930.
- Kuzmichev, A., Nishioka, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Reinberg, D. (2002). Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes & development* 16, 2893-2905.
- Lachner, M., and Jenuwein, T. (2002). The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14, 286-298.
- Landel, C.C., Kushner, P.J., and Greene, G.L. (1995). Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7, 23-28.
- Larochelle, M., and Gaudreau, L. (2003). H2A.Z has a function reminiscent of an activator required for preferential binding to intergenic DNA. *The EMBO journal* 22, 4512-4522.
- Lee, M.G., Norman, J., Shilatifard, A., and Shiekhata, R. (2007). Physical and functional association of a trimethyl H3K4 demethylase and Ring6a/MBLR, a polycomb-like protein. *Cell* 128, 877-887.

- Lee, M.G., Wynder, C., Cooch, N., and Shiekhataar, R. (2005). An essential role for CoREST in nucleosomal histone 3 lysine 4 demethylation. *Nature* 437, 432-435.
- Lee, S.U., Kim, B.T., Min, Y.K., and Kim, S.H. (2006). Protein profiling and transcript expression levels of heat shock proteins in 17beta-estradiol-treated human MCF-7 breast cancer cells. *Cell biology international* 30, 983-991.
- Leo, C., and Chen, J.D. (2000). The SRC family of nuclear receptor coactivators. *Gene* 245, 1-11.
- Letimier, F.A., Passini, N., Gasparian, S., Bianchi, E., and Rogge, L. (2007). Chromatin remodeling by the SWI/SNF-like BAF complex and STAT4 activation synergistically induce IL-12Rbeta2 expression during human Th1 cell differentiation. *The EMBO journal* 26, 1292-1302.
- Levin, E.R. (2009). G protein-coupled receptor 30: estrogen receptor or collaborator? *Endocrinology* 150, 1563-1565.
- Levine, M., and Tjian, R. (2003). Transcription regulation and animal diversity. *Nature* 424, 147-151.
- Li, H., Ilin, S., Wang, W., Duncan, E.M., Wysocka, J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2006). Molecular basis for site-specific read-out of histone H3K4me3 by the BPTF PHD finger of NURF. *Nature* 442, 91-95.
- Liefke, R., Oswald, F., Alvarado, C., Ferres-Marco, D., Mittler, G., Rodriguez, P., Dominguez, M., and Borggreffe, T. (2010). Histone demethylase KDM5A is an integral part of the core Notch-RBP-J repressor complex. *Genes & development* 24, 590-601.
- Liu, X.F., and Bagchi, M.K. (2004). Recruitment of distinct chromatin-modifying complexes by tamoxifen-complexed estrogen receptor at natural target gene promoters in vivo. *The Journal of biological chemistry* 279, 15050-15058.
- Lodish, H.F. (2005). *Biologie moléculaire de la cellule*, 3e éd. edn (Bruxelles, De Boeck).
- Lopez-Bigas, N., Kisiel, T.A., Dewaal, D.C., Holmes, K.B., Volkert, T.L., Gupta, S., Love, J., Murray, H.L., Young, R.A., and Benevolenskaya, E.V. (2008). Genome-wide analysis of the H3K4 histone demethylase RBP2 reveals a transcriptional program controlling differentiation. *Molecular cell* 31, 520-530.

Lu, C., Zhu, F., Cho, Y.Y., Tang, F., Zykova, T., Ma, W.Y., Bode, A.M., and Dong, Z. (2006). Cell apoptosis: requirement of H2AX in DNA ladder formation, but not for the activation of caspase-3. *Molecular cell* 23, 121-132.

Malik, R., Lenobel, R., Santamaria, A., Ries, A., Nigg, E.A., and Korner, R. (2009). Quantitative analysis of the human spindle phosphoproteome at distinct mitotic stages. *Journal of proteome research* 8, 4553-4563.

Mallepell, S., Krust, A., Chambon, P., and Briskin, C. (2006). Paracrine signaling through the epithelial estrogen receptor alpha is required for proliferation and morphogenesis in the mammary gland. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 2196-2201.

Mao, S., Neale, G. A., et Goorha, R. M. (1997). *Oncogene* 14, 1531-1539.

Martin, C., and Zhang, Y. (2005). The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews* 6, 838-849.

Mayya, V., Lundgren, D.H., Hwang, S.I., Rezaul, K., Wu, L., Eng, J.K., Rodionov, V., and Han, D.K. (2009). Quantitative phosphoproteomic analysis of T cell receptor signaling reveals system-wide modulation of protein-protein interactions. *Science signaling* 2, ra46.

Mellor, J. (2005). The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Molecular cell* 19, 147-157.

Metivier, R., Huet, G., Gallais, R., Finot, L., Petit, F., Tiffocche, C., Merot, Y., LePeron, C., Reid, G., Penot, G., *et al.* (2008). Dynamics of estrogen receptor-mediated transcriptional activation of responsive genes in vivo: apprehending transcription in four dimensions. *Adv Exp Med Biol* 617, 129-138.

Metivier, R., Penot, G., Hubner, M.R., Reid, G., Brand, H., Kos, M., and Gannon, F. (2003). Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* 115, 751-763.

Metzger, E., Wissmann, M., Yin, N., Muller, J.M., Schneider, R., Peters, A.H., Gunther, T., Buettner, R., and Schule, R. (2005). LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 437, 436-439.

Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., and Auricchio, F. (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *The EMBO journal* 15, 1292-1300.

Min, J., Feng, Q., Li, Z., Zhang, Y., and Xu, R.M. (2003). Structure of the catalytic domain of human DOT1L, a non-SET domain nucleosomal histone methyltransferase. *Cell* 112, 711-723.

Misteli, T., Gunjan, A., Hock, R., Bustin, M., and Brown, D.T. (2000). Dynamic binding of histone H1 to chromatin in living cells. *Nature* 408, 877-881.

Mizuguchi, G., Shen, X., Landry, J., Wu, W.H., Sen, S., and Wu, C. (2004). ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science (New York, NY)* 303, 343-348.

Mo, R., Rao, S.M., and Zhu, Y.J. (2006). Identification of the MLL2 complex as a coactivator for estrogen receptor alpha. *The Journal of biological chemistry* 281, 15714-15720.

Montano, M.M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P., and Katzenellenbogen, B.S. (1999). An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96, 6947-6952.

Mosammaparast, N., and Shi, Y. Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annual review of biochemistry* 79, 155-179.

Mosammaparast, N., and Shi, Y. (2010). Reversal of histone methylation: biochemical and molecular mechanisms of histone demethylases. *Annual review of biochemistry* 79, 155-179.

Mosselman, S., Polman, J., and Dijkema, R. (1996). ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392, 49-53.

Muchardt, C., and Yaniv, M. (1999). ATP-dependent chromatin remodelling: SWI/SNF and Co. are on the job. *Journal of molecular biology* 293, 187-198.



- Nandi, S., Guzman, R.C., and Yang, J. (1995). Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3650-3657.
- Nightingale, K.P., O'Neill, L.P. & Turner, B.M. (2006). Histone modifications: signalling receptors and potential elements of a heritable epigenetic code. *Curr Opin Genet Dev* 16, 125-136.
- Normanno, N., Di Maio, M., De Maio, E., De Luca, A., de Matteis, A., Giordano, A., and Perrone, F. (2005). Mechanisms of endocrine resistance and novel therapeutic strategies in breast cancer. *Endocrine-related cancer* 12, 721-747.
- Nye, A.C., Rajendran, R.R., Stenoi, D.L., Mancini, M.A., Katzenellenbogen, B.S., and Belmont, A.S. (2002). Alteration of large-scale chromatin structure by estrogen receptor. *Molecular and cellular biology* 22, 3437-3449.
- O'Lone, R., Frith, M.C., Karlsson, E.K., and Hansen, U. (2004). Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 18, 1859-1875.
- Okada, Y., Scott, G., Ray, M.K., Mishina, Y., and Zhang, Y. (2007). Histone demethylase JHDM2A is critical for Tnp1 and Prm1 transcription and spermatogenesis. *Nature* 450, 119-123.
- Olsen, J.V., Vermeulen, M., Santamaria, A., Kumar, C., Miller, M.L., Jensen, L.J., Gnad, F., Cox, J., Jensen, T.S., Nigg, E.A., *et al.* Quantitative phosphoproteomics reveals widespread full phosphorylation site occupancy during mitosis. *Science signaling* 3, ra3.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* (New York, NY 270, 1354-1357.
- Orford, K., Kharchenko, P., Lai, W., Dao, M.C., Worhunsky, D.J., Ferro, A., Janzen, V., Park, P.J., and Scadden, D.T. (2008). Differential H3K4 methylation identifies developmentally poised hematopoietic genes. *Developmental cell* 14, 798-809.
- Osley, M.A., Tsukuda, T., and Nickoloff, J.A. (2007). ATP-dependent chromatin remodeling factors and DNA damage repair. *Mutation research* 618, 65-80.

- Paik, W.K., and Kim, S. (1973). Enzymatic demethylation of calf thymus histones. *Biochem Biophys Res Commun* 51, 781-788.
- Paik, W.K., and Kim, S. (1974). Epsilon-alkyllysine. New assay method, purification, and biological significance. *Arch Biochem Biophys* 165, 369-378.
- Pasini, D., Hansen, K.H., Christensen, J., Agger, K., Cloos, P.A., and Helin, K. (2008). Coordinated regulation of transcriptional repression by the RBP2 H3K4 demethylase and Polycomb-Repressive Complex 2. *Genes & development* 22, 1345-1355.
- Pavri, R., Zhu, B., Li, G., Trojer, P., Mandal, S., Shilatifard, A., and Reinberg, D. (2006). Histone H2B monoubiquitination functions cooperatively with FACT to regulate elongation by RNA polymerase II. *Cell* 125, 703-717.
- Pedersen, M.T., and Helin, K. Histone demethylases in development and disease. *Trends in cell biology* 20, 662-671.
- Pray-Grant, M.G., Daniel, J.A., Schieltz, D., Yates, J.R., 3rd, and Grant, P.A. (2005). Chd1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA- and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 433, 434-438.
- Quinn, J., Fyrberg, A.M., Ganster, R.W., Schmidt, M.C., and Peterson, C.L. (1996). DNA-binding properties of the yeast SWI/SNF complex. *Nature* 379, 844-847.
- Ranjana W. Gunawardena, S.R.F., Hasan Siddiqui and Erik S. Knudsen (2007). SWI/SNF Activity Is Required for the Repression of Deoxyribonucleotide Triphosphate Metabolic Enzymes via the Recruitment of mSin3B. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 20116-20123.
- Rea, S., Eisenhaber, F., O'Carroll, D., Strahl, B.D., Sun, Z.W., Schmid, M., Opravil, S., Mechtler, K., Ponting, C.P., Allis, C.D., *et al.* (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* 406, 593-599.
- Redon C, P.D., Rogakou E, Sedelnikova O, Newrock K, et al. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Curr Opin Genet Dev* 12, 162-169.
- Redon, C., Pilch, D., Rogakou, E., Sedelnikova, O., Newrock, K., and Bonner, W. (2002). Histone H2A variants H2AX and H2AZ. *Current opinion in genetics & development* 12, 162-169.

Reid, G., Hubner, M.R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J., and Gannon, F. (2003). Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Molecular cell* 11, 695-707.

Revankar, C.M., Cimino, D.F., Sklar, L.A., Arterburn, J.B., and Prossnitz, E.R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* (New York, NY 307, 1625-1630.

Rikova, K., Guo, A., Zeng, Q., Possemato, A., Yu, J., Haack, H., Nardone, J., Lee, K., Reeves, C., Li, Y., *et al.* (2007). Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131, 1190-1203.

Robinson, P.J., Fairall, L., Huynh, V.A., and Rhodes, D. (2006). EM measurements define the dimensions of the "30-nm" chromatin fiber: evidence for a compact, interdigitated structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103, 6506-6511.

Robinson, P.J., and Rhodes, D. (2006). Structure of the '30 nm' chromatin fibre: a key role for the linker histone. *Curr Opin Struct Biol* 16, 336-343.

Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends in biochemical sciences* 21, 327-335.

Ruhl, D.D., Jin, J., Cai, Y., Swanson, S., Florens, L., Washburn, M.P., Conaway, R.C., Conaway, J.W., and Chrivia, J.C. (2006). Purification of a human SRCAP complex that remodels chromatin by incorporating the histone variant H2A.Z into nucleosomes. *Biochemistry* 45, 5671-5677.

Rundlett, S.E., Carmen, A.A., Kobayashi, R., Bavykin, S., Turner, B.M., and Grunstein, M. (1996). HDA1 and RPD3 are members of distinct yeast histone deacetylase complexes that regulate silencing and transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14503-14508.

Ruthenburg AJ, A.C., Wysocka J. (2007). Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell* 25, 15-30.

Saha, A., Wittmeyer, J., and Cairns, B.R. (2006). Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nature reviews* 7, 437-447.

Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y., and Hume, D.A. (2007). Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat Rev Genet* 8, 424-436.

Santisteban, M.S., Kalashnikova, T., and Smith, M.M. (2000). Histone H2A.Z regulates transcription and is partially redundant with nucleosome remodeling complexes. *Cell* 103, 411-422.

Schalch, T., Duda, S., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (2005). X-ray structure of a tetranucleosome and its implications for the chromatin fibre. *Nature* 436, 138-141.

Schneider, R., Bannister, A.J., Myers, F.A., Thorne, A.W., Crane-Robinson, C., and Kouzarides, T. (2004). Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes. *Nature cell biology* 6, 73-77.

Secombe, J., and Eisenman, R.N. (2007). The function and regulation of the JARID1 family of histone H3 lysine 4 demethylases: the Myc connection. *Cell Cycle* 6, 1324-1328.

Shang, Y., Hu, X., DiRenzo, J., Lazar, M.A., and Brown, M. (2000). Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell* 103, 843-852.

Shao, D., and Lazar, M.A. (1999). Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* 103, 1617-1618.

Shen, X., Kim, W., Fujiwara, Y., Simon, M.D., Liu, Y., Mysliwiec, M.R., Yuan, G.C., Lee, Y., and Orkin, S.H. (2009). Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell* 139, 1303-1314.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J.R., Cole, P.A., Casero, R.A., and Shi, Y. (2004). Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119, 941-953.

Sims, R.J., 3rd, Chen, C.F., Santos-Rosa, H., Kouzarides, T., Patel, S.S., and Reinberg, D. (2005). Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *The Journal of biological chemistry* 280, 41789-41792.

- Sims, R.J., 3rd, and Reinberg, D. (2006). Histone H3 Lys 4 methylation: caught in a bind? *Genes & development* *20*, 2779-2786.
- Smale, S.T. (2001). Core promoters: active contributors to combinatorial gene regulation. *Genes & development* *15*, 2503-2508.
- Spencer, C.A., and Groudine, M. (1990). Transcription elongation and eukaryotic gene regulation. *Oncogene* *5*, 777-785.
- Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* *403*, 41-45.
- Sudarsanam, P., and Winston, F. (2000). The Swi/Snf family nucleosome-remodeling complexes and transcriptional control. *Trends Genet* *16*, 345-351.
- Sullivan, K.F., Hechenberger, M., and Masri, K. (1994). Human CENP-A contains a histone H3 related histone fold domain that is required for targeting to the centromere. *The Journal of cell biology* *127*, 581-592.
- Suto, R.K., Clarkson, M.J., Tremethick, D.J., and Luger, K. (2000). Crystal structure of a nucleosome core particle containing the variant histone H2A.Z. *Nature structural biology* *7*, 1121-1124.
- Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Patel, D.J. (2007). How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature structural & molecular biology* *14*, 1025-1040.
- Tremethick, D.J. (2007). Higher-order structures of chromatin: the elusive 30 nm fiber. *Cell* *128*, 651-654.
- Tsukada, Y., Fang, J., Erdjument-Bromage, H., Warren, M.E., Borchers, C.H., Tempst, P., and Zhang, Y. (2006). Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* *439*, 811-816.
- Tu, S., Teng, Y.C., Yuan, C., Wu, Y.T., Chan, M.Y., Cheng, A.N., Lin, P.H., Juan, L.J., and Tsai, M.D. (2008). The ARID domain of the H3K4 demethylase RBP2 binds to a DNA CCGCCC motif. *Nature structural & molecular biology* *15*, 419-421.

Tzschach, A., Lenzner, S., Moser, B., Reinhardt, R., Chelly, J., Fryns, J.P., Kleefstra, T., Raynaud, M., Turner, G., Ropers, H.H., *et al.* (2006). Novel JARID1C/SMCX mutations in patients with X-linked mental retardation. *Hum Mutat* 27, 389.

van Oevelen, C., Wang, J., Asp, P., Yan, Q., Kaelin, W.G., Jr., Kluger, Y., and Dynlacht, B.D. (2008). A role for mammalian Sin3 in permanent gene silencing. *Molecular cell* 32, 359-370.

Verdone, L., Caserta, M., and Di Mauro, E. (2005). Role of histone acetylation in the control of gene expression. *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 83, 344-353.

Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., and Zhang, Y. (2006). Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Molecular cell* 22, 383-394.

Wang, L., Jin, Q., Lee, J.E., Su, I.H., and Ge, K. Histone H3K27 methyltransferase Ezh2 represses Wnt genes to facilitate adipogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 7317-7322.

Watters, J.J., Campbell, J.S., Cunningham, M.J., Krebs, E.G., and Dorsa, D.M. (1997). Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 138, 4030-4033.

Wei, Y., Chen, Y.H., Li, L.Y., Lang, J., Yeh, S.P., Shi, B., Yang, C.C., Yang, J.Y., Lin, C.Y., Lai, C.C., *et al.* CDK1-dependent phosphorylation of EZH2 suppresses methylation of H3K27 and promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Nature cell biology* 13, 87-94.

Welboren, W.J., Sweep, F.C., Span, P.N., and Stunnenberg, H.G. (2009). Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated? *Endocrine-related cancer* 16, 1073-1089.

Wilson, C.J., Chao, D.M., Imbalzano, A.N., Schnitzler, G.R., Kingston, R.E., and Young, R.A. (1996). RNA polymerase II holoenzyme contains SWI/SNF regulators involved in chromatin remodeling. *Cell* 84, 235-244.

Wissmann, M., Yin, N., Muller, J.M., Greschik, H., Fodor, B.D., Jenuwein, T., Vogler, C., Schneider, R., Gunther, T., Buettner, R., *et al.* (2007). Cooperative demethylation by JMJD2C and LSD1 promotes androgen receptor-dependent gene expression. *Nature cell biology* 9, 347-353.

Xiang, Y., Zhu, Z., Han, G., Ye, X., Xu, B., Peng, Z., Ma, Y., Yu, Y., Lin, H., Chen, A.P., *et al.* (2007). JARID1B is a histone H3 lysine 4 demethylase up-regulated in prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104, 19226-19231.

Xu, L., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current opinion in genetics & development* 9, 140-147.

Yamane, K., Tateishi, K., Klose, R.J., Fang, J., Fabrizio, L.A., Erdjument-Bromage, H., Taylor-Papadimitriou, J., Tempst, P., and Zhang, Y. (2007). PLU-1 is an H3K4 demethylase involved in transcriptional repression and breast cancer cell proliferation. *Molecular cell* 25, 801-812.

Yamane, K., Toumazou, C., Tsukada, Y., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Wong, J., and Zhang, Y. (2006). JHDM2A, a JmJc-containing H3K9 demethylase, facilitates transcription activation by androgen receptor. *Cell* 125, 483-495.

Yoshinaga, S.K., Peterson, C.L., Herskowitz, I., and Yamamoto, K.R. (1992). Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors. *Science (New York, NY)* 258, 1598-1604.

You, A., Tong, J.K., Grozinger, C.M., and Schreiber, S.L. (2001). CoREST is an integral component of the CoREST- human histone deacetylase complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 1454-1458.

Yu, B.D., Hess, J.L., Horning, S.E., Brown, G.A., and Korsmeyer, S.J. (1995). Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature* 378, 505-508.

Zeng, L., Zhang, Q., Gerona-Navarro, G., Moshkina, N., and Zhou, M.M. (2008). Structural basis of site-specific histone recognition by the bromodomains of human coactivators PCAF and CBP/p300. *Structure* 16, 643-652.

Zhang, Y., Liu, T., Meyer, C.A., Eeckhoute, J., Johnson, D.S., Bernstein, B.E., Nusbaum, C., Myers, R.M., Brown, M., Li, W., *et al.* (2008). Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome biology* 9, R137.